

71

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international**



**(43) Date de la publication internationale
23 janvier 2003 (23.01.2003)**

PCT

**(10) Numéro de publication internationale
WO 03/006497 A2**

**(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/435**

(JP). ROSSIER, Jean [BE/FR]; 322, rue Saint-Jacques,
F-75005 Paris (FR).

**(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02492**

(74) Mandataires : DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.a.r.l., 20, rue de Maubeuge,
F-75009 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 12 juillet 2002 (12.07.2002)

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Langue de publication : français

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

**(30) Données relatives à la priorité :
01/09293 12 juillet 2001 (12.07.2001) FR**

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).**

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LAMBOLEZ, Bertrand [FR/FR]; 54, rue Louis Blanc, F-75010 Paris (FR). GIBELIN, Nathalie [FR/FR]; 16, Chemin de la Justice, F-92290 Chatenay Malabry (FR). BOUROUT, Gaëlle [FR/FR]; 17, rue Albert Bayet, F-75013 Paris (FR). TRICOIRE, Ludovic, Eric [FR/FR]; 7, rue Théophile Gautier, F-92120 Montrouge (FR). COURJEAN, Olivier, Arsène [FR/FR]; 32, boulevard de Reuilly, F-75012 Paris (FR). TSUZUKI, Keisuke [JP/JP]; 4-21-7 Iwagami-machi, Maebashi, Gunma 371-0035

(54) Title: MUTATED PHOTOPROTEINS AND THEIR USES

(54) Titre : PHOTOPROTÉINES MUTEES ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns mutated photoproteins derived from isolated jellyfish photoproteins, said mutated photoproteins being characterised in that they exhibit a thermostability higher than that of the photoproteins from which they are derived, and are called thermostable mutated photoproteins, and/or a luminescence duration longer than that of the photoproteins from which they are derived, and are called persistent mutated photoproteins. The invention also concerns the use of said mutated photoproteins in methods for detecting *in vitro* molecules in a biological sample, methods for detecting compounds with enzymatic activity in a biological sample, or methods for detecting intracellular calcium variations.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet des photoprotéines mutées dérivées des photoprotéines isolées de méduses, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées par une thermostabilité supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, et sont désignées photoprotéines mutées thermostables, et/ou par un temps de luminescence supérieur à celui des photoprotéines dont elles dérivent, et sont désignées photoprotéines mutées persistantes. L'invention concerne également l'utilisation des photoprotéines mutées susmentionnées dans le cadre de la mise en oeuvre de procédés de détection *in vitro* de molécules dans un échantillon biologique, de procédés de détection de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique, ou de procédés de détection des variations de calcium intracellulaire.

WO 03/006497 A2

PHOTOPROTEINES MUTÉES ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention a pour objet des photoprotéines mutées dérivées des photoprotéines isolées de méduses, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées par une thermostabilité supérieure, et/ou par un temps de luminescence supérieur à ceux des photoprotéines dont elles dérivent, ainsi que les utilisations de ces protéines, notamment dans le cadre de la mise en œuvre de procédés de détection *in vitro* de molécules, de procédés de détection de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique, ou de procédés de détection des variations de calcium intracellulaire induites par divers agents.

L'aequorine est une photoprotéine de la méduse *Aequoria Victoria* qui est constituée d'une partie protéique appelée l'apoequorine et d'un groupement prosthétique, la coelenterazine. Cette photoprotéine a la propriété d'émettre de la lumière lorsqu'elle est en présence d'ions Calcium (Ca^{2+}). Cette propriété permet notamment de détecter les variations de Calcium dans les cellules. Cette photoprotéine est également utilisée comme marqueur pour détecter de faibles quantités de produits organiques (jusqu'à moins d'une centaine de molécules) en raison d'un rapport signal sur bruit de fond extrêmement élevé.

Ainsi, l'aequorine commence à être utilisée dans des systèmes commerciaux de détection de molécules. Son utilisation offre plusieurs avantages : une très grande gamme dynamique qui permet de détecter et de quantifier les molécules sur plusieurs ordres de grandeur, et un bruit de fond extrêmement faible qui permet de détecter la présence de seulement quelques dizaines de molécules dans un échantillon. Ceci permet d'éviter le recours aux techniques d'amplification, telles que la PCR pour la détection des acides nucléiques.

Cependant, les photoprotéines naturelles, et l'aequorine en particulier sont très sensibles aux variations de température qui peuvent dénaturer leur pouvoir d'émission de lumière.

Par ailleurs, la cinétique d'émission de la photoprotéine naturelle est extrêmement rapide (de l'ordre de la seconde) et oblige à une analyse « échantillon par échantillon » dans un luminomètre à injection rapide. Ceci pose un problème pour

utiliser l'aequorine dans un système de criblage à haut débit qui nécessite l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillon (HTS, High Throughput Screening).

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs du fait que certaines mutations dans la séquence peptidique de l'aequorine permettent d'obtenir des mutants d'aequorine beaucoup moins sensibles à la température (à 37°C, les photoprotéines mutantes perdent leurs propriétés photoémettrices en quelques jours au lieu de quelques heures pour la protéine naturelle), ainsi que des mutants ayant une cinétique d'émission lumineuse très ralentie (de la dizaine de secondes à la minute) qui permettent d'analyser simultanément les échantillons (format microplaqué à multipuits).

Ainsi la présente invention a principalement pour but de fournir de nouvelles photoprotéines moins sensibles aux élévations de température, et dont le transport et le stockage se trouvent être facilités en raison de leur meilleure stabilité.

La présente invention a pour but également de fournir de nouvelles photoprotéines résistantes jusqu'à 50°C, ce qui simplifie leur utilisation, notamment dans les expériences de détection d'acides nucléiques.

L'invention a également pour but de fournir de nouvelles photoprotéines dont le temps de luminescence est nettement supérieur à celui des photoprotéines dont elles dérivent, ce qui permet de les utiliser dans le cadre du criblage à haut débit, notamment pour la détection *in vitro* de molécules organiques à l'état de trace.

L'invention a également pour but de fournir des kits comprenant ces nouvelles photoprotéines, pour la mise en œuvre de procédés de mesure et de détection tels que mentionnés ci-dessus.

L'invention a principalement l'utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation de photoprotéines mutées ayant une thermostabilité supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, encore désignées photoprotéines mutées thermostables, et/ou par un temps de luminescence supérieur à celui des photoprotéines dont elles dérivent, encore désignées photoprotéines mutées persistantes, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées en ce que leur stabilité dans le temps est augmentée à 37°C d'un facteur d'au moins environ 10, et/ou en ce que leur temps de luminescence est augmenté d'un facteur d'au moins environ 10, par rapport aux photoprotéines dont elles dérivent.

Il convient de souligner que par l'expression photoprotéine mutée dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute photoprotéine constituée d'une partie protéique dérivée par mutation de la partie protéique de la photoprotéine de méduse d'origine, et d'un groupement prosthétique, telle que la coelenterazine.

5 L'invention a également pour objet un procédé de préparation de photoprotéines mutées thermostables, et/ou persistantes, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées en ce que leur stabilité dans le temps est augmentée à 37°C d'un facteur d'au moins environ 10, et/ou en ce que leur temps de luminescence est augmenté d'un facteur d'au moins environ 10, par rapport aux photoprotéines de méduse dont elles dérivent, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre d'une ou plusieurs mutations desdites photoprotéines de méduse, lesdites mutations étant choisies parmi :

10 * au moins une des trois mutations augmentant la thermostabilité desdites photoprotéines, et choisie parmi les suivantes :

15 - suppression de la lysine (K) contenue dans le motif RHKX₁MFX₂ dans lequel X₁=H ou F, et X₂= N ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette lysine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette lysine par une arginine,

20 - suppression de la glutamine (Q) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette glutamine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette glutamine par une arginine,

- suppression de la leucine (L) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY susmentionné, ou substitution de cette leucine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette leucine par une isoleucine,

25 * et/ou au moins une des six mutations augmentant le temps de luminescence desdites photoprotéines, et choisie parmi les suivantes :

30 - suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DX₁NX₂X₃GX₄IX₅LX₆E dans lequel X₁=V ou I, X₂=H, G ou S, X₃=N ou D, X₄=K ou Q, X₅=S, T ou N, et X₆=D ou N, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

- suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE dans lequel X₁=Q, G ou R, X₂=N ou S, X₃=A, S ou T, X₄=I

ou V, et X₅=T ou S, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

5 - suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE susmentionné, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

10 - suppression de la phénylalanine (F) contenue dans le motif EX₁TFX₂X₃ dans lequel X₁=E, K ou A, X₂=R, K ou A, et X₃=V ou H, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette phénylalanine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette phénylalanine par une sérine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

15 - suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DX₁DX₂X₃GX₄LDVDE, dans lequel X₁=I ou L, X₂=E, N ou G, X₃=S ou D, et X₄=Q, K ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

20 - suppression de la valine en position 54 de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 de l'aequorine, ou substitution de cette valine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette valine par une alanine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine.

25 L'invention concerne également l'utilisation des photoprotéines mutées thermostables et/ou persistantes pour la mise en œuvre de :

30 - de procédés de détection *in vitro* de molécules, tels que des protéines ou antigènes ou des acides nucléiques dans un échantillon biologique, notamment dans le cadre du dépistage *in vitro* de bactéries telles que les *Listeria* dans les aliments, ou dans le cadre du dépistage d'agents pathogènes tels que le virus VIH chez l'homme,

- de procédés de détection de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique, notamment dans le cadre du criblage de molécules activant ou inhibant une activité enzymatique spécifique,

- de procédés de détection des variations de calcium intracellulaire induites par divers agents, notamment dans le cadre du criblage de molécules agissant sur une séquence nucléique ou protéique fusionnée à la photoprotéine mutée, ou coexprimée avec la photoprotéine mutée dans des cellules hôtes susmentionnées,

5 dans lesquels les températures utilisées peuvent atteindre plus de 50°C, et/ou le temps de lecture après activation de la photoprotéine peut être supérieur à 5 min, ce qui limite considérablement les bruits de lecture.

10 L'invention a également pour objet les photoprotéines mutées dérivées des photoprotéines isolées de méduses, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées par une thermostabilité supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, et sont désignées photoprotéines mutées thermostables, et/ou par un temps de luminescence supérieur à celui des photoprotéines dont elles dérivent, et sont désignées photoprotéines mutées persistantes.

15 Avantageusement, les photoprotéines mutées selon l'invention, sont telles que la stabilité dans le temps est augmentée à 37°C d'un facteur d'au moins environ 10, et/ou leur temps de luminescence est augmenté d'un facteur d'au moins environ 10, par rapport aux photoprotéines dont elles dérivent.

20 Avantageusement encore, les photoprotéines mutées selon l'invention, sont caractérisées en ce qu'elles sont stables pendant au moins environ 30 minutes jusqu'à la température d'environ 50°C, et en ce qu'elles peuvent être conservées pendant au moins environ 4 jours à des températures pouvant atteindre jusqu'à 37°C, et/ou en ce que leur temps de luminescence est compris entre environ 1 min et environ 5 min.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet les photoprotéines mutées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent :

* au moins une des trois mutations augmentant leur thermostabilité, choisie parmi les suivantes :

30 - suppression de la lysine (K) contenue dans le motif RHKX₁MFX₂ dans lequel X₁=H ou F, et X₂= N ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette lysine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette lysine par une arginine,

- suppression de la glutamine (Q) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette glutamine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette glutamine par une arginine,

- suppression de la leucine (L) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY susmentionné, ou substitution de cette leucine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette leucine par une isoleucine,

5 * et/ou au moins une des six mutations augmentant leur temps de luminescence, choisie parmi les suivantes :

- suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DX₁NX₂X₃GX₄IX₅LX₆E dans lequel X₁=V ou I, X₂=H, G ou S, X₃=N ou D, X₄=K ou Q, X₅=S, T ou N, et X₆=D ou N, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

10 - suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE dans lequel X₁=Q, G ou R, X₂=N ou S, X₃=A, S ou T, X₄=I ou V, et X₅=T ou S, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

15 - suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE susmentionné, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

20 - suppression de la phénylalanine (F) contenue dans le motif EX₁TFX₂X₃ dans lequel X₁=E, K ou A, X₂=R, K ou A, et X₃=V ou H, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette phénylalanine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette phénylalanine par une sérine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

25 - suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DX₁DX₂X₃GX₄LDVDE, dans lequel X₁=I ou L, X₂=E, N ou G, X₃=S ou D, et X₄=Q, K ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

- suppression de la valine en position 54 de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 de l'aequorine, ou substitution de cette valine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette valine par une alanine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine.

5 Des photoprotéines mutées thermostables particulièrement préférées selon l'invention, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une des deux mutations suivantes :

10 - suppression de la glutamine contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette glutamine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette glutamine par une arginine,

15 - suppression de la leucine contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY susmentionné, ou substitution de cette leucine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette leucine par une isoleucine.

Des photoprotéines mutées persistantes particulièrement préférées selon l'invention, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une des mutations suivantes :

20 - suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE dans lequel X₁=Q, G ou R, X₂=N ou S, X₃=A, S ou T, X₄=I ou V, et X₅=T ou S, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

25 - suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE susmentionné, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

30 - suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DX₁DX₂X₃GX₄LDVDE, dans lequel X₁=I ou L, X₂=E, N ou G, X₃=S ou D, et X₄=Q, K ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine.

L'invention a plus particulièrement pour objet les photoprotéines mutées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles dérivent de :

- l'aequorine extraite de la méduse *Aequoria Victoria*, ladite aequorine étant telle que représentée par la séquence SEQ ID NO : 2,
- 5 - la clytine extraite de la méduse *Clytia gregaria*, ladite clytine étant telle que représentée par la séquence SEQ ID NO : 18,
- la mitrocomine extraite de la méduse *Mitrocoma cellularia*, ladite mitrocomine étant telle que représentée par la séquence SEQ ID NO : 34,
- 10 - ou de l'obéline extraite de la méduse *Obelia longissima*, ladite obéline étant telle que représentée par la séquence SEQ ID NO : 50.

L'invention concerne plus particulièrement les photoprotéines mutées thermostables dérivées de l'aequorine telles que définies ci-dessus, et choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 4, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la lysine en position 27 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 6, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la glutamine en position 178 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 8, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la leucine en position 180 est remplacée par une isoleucine,
- 15 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 10, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la lysine en position 27 est remplacée par une arginine, et la glutamine en position 178 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 12, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la lysine en position 27 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 180 est remplacée par une isoleucine,
- 20 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 14, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la glutamine en position 178 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 180 est remplacée par une isoleucine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 16, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la lysine en position 27 est remplacée par une arginine, la glutamine en position 178 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 180 est remplacée par une isoleucine,
- 25

L'invention a particulièrement pour objet les photoprotéines mutées thermostables dérivées de la clytine telles que définies ci-dessus, choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 20, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la lysine en position 26 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 22, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la glutamine en position 177 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 24, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la leucine en position 179 est remplacée par une isoleucine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 26, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la lysine en position 26 est remplacée par une arginine, et la glutamine en position 177 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 28, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la lysine en position 26 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 179 est remplacée par une isoleucine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 30, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la glutamine en position 177 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 179 est remplacée par une isoleucine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 32, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la lysine en position 26 est remplacée par une arginine, la glutamine en position 177 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 179 est remplacée par une isoleucine,

L'invention concerne plus particulièrement les photoprotéines mutées thermostables dérivées de la mitrocomine telles que définies ci-dessus, choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 36, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la lysine en position 25 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 38, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la glutamine en position 176 est remplacée par une arginine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 40, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la leucine en position 178 est remplacée par une isoleucine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 42, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la lysine en position 25 est remplacée par une arginine, et la glutamine en position 176 est remplacée par une arginine,

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 44 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la lysine en position 25 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 178 est remplacée par une isoleucine,

5 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 46, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la glutamine en position 176 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 178 est remplacée par une isoleucine,

10 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 48, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la lysine en position 25 est remplacée par une arginine, la glutamine en position 176 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 178 est remplacée par une isoleucine.

L'invention concerne plus particulièrement les photoprotéines mutées thermostables dérivées de l'obéline telles que définies ci-dessus, choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

15 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 52, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la lysine en position 23 est remplacée par une arginine,

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 54, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la glutamine en position 174 est remplacée par une arginine,

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 56, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la leucine en position 176 est remplacée par une isoleucine,

20 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 58, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la lysine en position 23 est remplacée par une arginine, et la glutamine en position 174 est remplacée par une arginine,

25 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 60, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la lysine en position 23 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 176 est remplacée par une isoleucine,

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 62 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la glutamine en position 174 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 176 est remplacée par une isoleucine,

30 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 64, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la lysine en position 23 est remplacée par une arginine, la glutamine en position 174 est remplacée par une arginine, et la leucine en position 176 est remplacée par une isoleucine.

L'invention concerne plus particulièrement les photoprotéines mutées persistantes dérivées de l'aequorine telles que définies ci-dessus, et choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 66 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle le glutamate en position 45 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 68 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la valine en position 54 est remplacée par une alanine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 70 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle l'aspartate en position 127 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 72 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle le glutamate en position 138 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 74 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle la phénylalanine en position 159 est remplacée par une sérine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 76 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 dans laquelle l'aspartate en position 163 est remplacé par une glycine.

L'invention a particulièrement pour objet les photoprotéines mutées persistantes dérivées de la clytine telles que définies ci-dessus, choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 78 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle le glutamate en position 44 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 80 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle l'aspartate en position 126 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 82 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle le glutamate en position 137 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 84 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle la phénylalanine en position 158 est remplacée par une sérine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 86 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 18 dans laquelle l'aspartate en position 162 est remplacé par une glycine.

L'invention concerne plus particulièrement les photoprotéines mutées persistantes dérivées de la mitrocomine telles que définies ci-dessus, choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 88 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle le glutamate en position 43 est remplacé par une glycine,

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 90 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle l'aspartate en position 125 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 92 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle le glutamate en position 136 est remplacé par une glycine,
- 5 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 94 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle la phénylalanine en position 157 est remplacée par une sérine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 96 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 34 dans laquelle l'aspartate en position 161 est remplacé par une glycine.

10 L'invention concerne plus particulièrement les photoprotéines mutées persistantes dérivées de l'obéline telles que définies ci-dessus, choisies parmi les protéines comprenant les séquences suivantes :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 98 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle le glutamate en position 41 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 100 correspondant à la séquence SEQ ID 15 NO : 50 dans laquelle l'aspartate en position 123 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 102 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle le glutamate en position 134 est remplacé par une glycine,
- la séquence peptidique SEQ ID NO : 104 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle la phénylalanine en position 155 est remplacée par une sérine,
- 20 - la séquence peptidique SEQ ID NO : 106 correspondant à la séquence SEQ ID NO : 50 dans laquelle l'aspartate en position 159 est remplacé par une glycine.

L'invention a plus particulièrement pour objet les photoprotéines mutées thermostables et persistantes telles que définies ci-dessus, choisies parmi :

- les protéines dérivées de l'aequorine de séquences SEQ ID NO : 107, 108, 109, 25 110, 111, 112, 113, et correspondant aux séquences SEQ ID NO : 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, dans lesquelles E en position 45 est remplacé par G, et/ou V en position 54 est remplacé par A, et/ou D en position 127 est remplacé par G, et/ou E en position 138 est remplacé par G, et/ou F en position 159 est remplacé par S, et/ou D en position 163 est remplacé par G,
- les protéines dérivées de la clytine de séquences SEQ ID NO : 114, 115, 116, 30 117, 118, 119, 120, et correspondant aux séquences suivantes : SEQ ID NO : 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, dans lesquelles E en position 44 est remplacé par G, et/ou D en position 126 est remplacé par G, et/ou E en position 137 est remplacé par G, et/ou F en position 158 est remplacé par S, et/ou D en position 162 est remplacé par G,

5 - les protéines de la mitrocomine de séquences SEQ ID NO : 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, et correspondant aux séquences suivantes : SEQ ID NO : 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, dans lesquelles E en position 43 est remplacé par G, et/ou D en position 125 est remplacé par G, et/ou E en position 136 est remplacé par G, et/ou F en position 157 est remplacé par S, et/ou D en position 161 est remplacé par G,

10 - les protéines dérivées de l'obéline de séquences SEQ ID NO : 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, et correspondant aux séquences suivantes : SEQ ID NO : 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, dans lesquelles E en position 41 est remplacé par G, et/ou D en position 123 est remplacé par G, et/ou E en position 134 est remplacé par G, et/ou F en position 155 est remplacé par S, et/ou D en position 159 est remplacé par G.

L'invention a plus particulièrement pour objet les photoprotéines mutées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles sont liées :

- 15 - à une sonde protéique ou nucléique susceptible de reconnaître des antigènes ou protéines ou acides nucléiques déterminés,
- ou à un substrat spécifique d'une activité enzymatique déterminée,
- ou à une molécule susceptible de former un complexe avec une autre molécule, tel que le complexe avidine-biotine.

20 L'invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les photoprotéines mutées définies ci-dessus.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les séquences nucléotidiques susmentionnées, codant pour les photoprotéines mutées telles que définies ci-dessus, choisies parmi les acides nucléiques comprenant les séquences SEQ ID NO : 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, codant respectivement pour les séquences SEQ ID NO : 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, ou toute séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique des séquences susmentionnées et codant pour les photoprotéines mutées susmentionnées.

25 30 L'invention concerne également les vecteurs, notamment les plasmides, contenant une séquence recombinante comprenant une séquence nucléotidique de l'invention telle que définie ci-dessus.

L'invention a également pour objet les cellules hôtes, telles que cellules procaryotes, notamment *E. coli*, ou eucaryotes, notamment les lignées HEK 293

(American Type Culture Collection ATCC n° CRL-1573) ou CHO (ATCC n° CCL-61), comprenant une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, lesdites cellules étant telles qu'obtenues par transformation à l'aide d'un vecteur susmentionné.

5 L'invention concerne également tout procédé de préparation de photoprotéines mutées telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de cellules hôtes appropriées à l'aide d'un vecteur susmentionné, la mise en culture de cellules hôtes transformées ainsi obtenues dans un milieu approprié, et la récupération, le cas échéant après purification, des photoprotéines mutées produites par ces cellules, suivie le cas échéant d'une étape de liaison au groupement prosthétique, telle que la 10 coelenterazine.

L'invention a également pour objet l'utilisation de photoprotéines mutées telles que définies ci-dessus, ou de cellules hôtes transformées susmentionnées exprimant lesdites photoprotéines mutées, dans le cadre de la mise en œuvre :

15 - de procédés de détection *in vitro* de molécules, tels que des protéines ou antigènes ou des acides nucléiques dans un échantillon biologique, notamment dans le cadre du dépistage *in vitro* de bactéries telles que les *Listeria* dans les aliments, ou dans le cadre du dépistage d'agents pathogènes tels que le virus VIH chez l'homme,

20 - de procédés de détection de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique, notamment dans le cadre du criblage de molécules activant ou inhibant une activité enzymatique spécifique,

- de procédés de détection des variations de calcium intracellulaire induites par divers agents, notamment dans le cadre du criblage de molécules agissant sur une séquence nucléique ou protéique fusionnée à la photoprotéine mutée, ou coexprimée avec la photoprotéine mutée dans des cellules hôtes susmentionnées.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet des procédés de détection *in vitro* de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques dans un échantillon biologique, tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils comprennent principalement les étapes suivantes :

30 - le cas échéant, une étape d'amplification du nombre d'acides nucléiques présents dans l'échantillon biologique,

- immobilisation des protéines ou antigènes ou acides nucléiques sur un support approprié, puis addition d'une sonde spécifique desdits protéines ou antigènes ou acides nucléiques et rinçage, ladite sonde étant liée à une photoprotéine mutée telle que définie

ci-dessus, ou ladite photoprotéine étant additionnée sur le support avec les réactifs appropriés pour sa liaison à ladite sonde,

- mesure de l'intensité de la bioluminescence émise après l'étape de rinçage.

5 L'invention a également pour objet les procédés de détection *in vitro* de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils comprennent principalement les étapes suivantes :

- immobilisation sur un support approprié d'un substrat protéique spécifique de l'activité enzymatique à détecter, ce substrat étant lié à une photoprotéine mutée telle que définie ci-dessus, addition de l'échantillon biologique, puis rinçage,
- 10 - ou immobilisation sur un support approprié des composés de l'échantillon biologique, addition du substrat protéique lié à une photoprotéine mutée telle que définie ci-dessus, puis rinçage,
- mesure de l'intensité de la bioluminescence émise après l'étape de rinçage.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet encore, les procédés de détection *in vitro* des variations de calcium intracellulaire induites par divers agents tels que définis ci-dessus; caractérisés en ce qu'ils comprennent la mise en culture de cellules transformées susmentionnées, avec l'échantillon contenant les molécules à détecter, et la mesure de la variation de bioluminescence.

20 Avantageusement, les procédés susmentionnés selon l'invention, sont caractérisés en ce qu'ils peuvent être effectués jusqu'à des températures d'environ 50 °C, à l'aide de photoprotéines mutées thermostables, et, le cas échéant, persistantes, telles que définies ci-dessus.

25 Avantageusement encore, les procédés susmentionnés selon l'invention, sont caractérisés en ce qu'ils peuvent être effectués en simultanés sur échantillons multiples, à l'aide de photoprotéines persistantes, et, le cas échéant, thermostables, telles que définies ci-dessus.

30 L'invention a également pour objet les kits ou trousse, pour la mise en œuvre de procédés tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils comprennent des photoprotéines mutées susmentionnées, le cas échéant en association avec des réactifs nécessaires à la mise en œuvre desdits procédés.

L'invention a plus particulièrement pour objet les kits tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils peuvent être conservés en solutions prêtées à l'emploi, notamment pendant au moins environ 4 jours à des températures ambiantes d'environ 20°C, et pouvant atteindre jusqu'à environ 37°C, lorsqu'ils contiennent des

photoprotéines mutées thermostables, et, le cas échéant, persistantes, telles que définies ci-dessus.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit d'obtention de photoprotéines mutées telles que définies ci-dessus, et des conditions d'utilisation de ces photoprotéines dans le cadre des applications susmentionnées de ces dernières.

A) Obtention de mutants thermostables de la photoprotéine aequorine

10 Protocoles

La procédure employée a consisté en la réalisation d'une banque de mutants aléatoires d'aequorine générés par la technique de "DNA shuffling" (ou brassage de l'ADN) (Stemmer, WPC, 1994). Ces mutants, insérés dans un vecteur d'expression procaryotique ont été transformés dans *E. coli* et clonés. Les clones ont été criblés individuellement pour une augmentation de bioluminescence. Les meilleurs mutants ont alors été utilisés pour un deuxième tour de DNA shuffling suivi d'un criblage identique. Ce processus a été répété une troisième fois. Trois mutations qui augmentaient l'activité de l'aequorine ont été répertoriées. Lors des test subséquents, nous avons pu montrer que ces mutations n'augmentent pas l'émission de lumière de l'aequorine mais augmentent sa stabilité. Ceci explique que ces mutants aient été sélectionnés dans notre système cellulaire procaryotique (*E. coli*). Pour l'un de ces mutants, les tests montrent une augmentation du temps de demi-vie à 37°C d'un facteur 12.5 en système cellulaire procaryotique et d'un facteur 7.5 pour la protéine purifiée, par rapport à l'aequorine sauvage. De même, la température de demi-inactivation de ce mutant lors d'un choc thermique de 30 minutes est supérieure de 10 degrés Celsius à celle de l'aequorine sauvage (expérience réalisée en système cellulaire et sur protéine purifiée). Ce même mutant montre une légère réduction d'affinité pour le calcium par rapport à l'aequorine sauvage, ce qui est un avantage pour une utilisation de l'aequorine *in vitro*.

30 DNA shuffling

Le cDNA de l'aequorine « sauvage » (Aeqwt, ~600 bp) a été sous-cloné aux sites *Kpn*I (5') et *Eco*RI (3') du vecteur pPD16 sous dépendance du promoteur Plac. Ce clone a été nommé pPD-Aeqwt. 20 ng du plasmide pPD-Aeqwt a été digéré par *Pst*I et *Eag*I (sites externes à l'insert aequorine dans le polylinker de pPD16) et l'insert Aeqwt

amplifié par PCR en utilisant les amores suivantes : up-e-Aeq, 5' CGG GTA CCG ATG CTTTATGATGTTCCCTGAT 3' et lo-e-Aeq, 5' TGGAATTC TTA GGGGACAGCTCCAC 3'. Le produit de PCR résultant a été purifié (Qiaquick extraction kit, Qiagen). 3 µg du produit purifié a été digéré par la DNaseI (1 ng/µl) dans 100 µl de tampon DNase I à 25°C pendant 7 min. Les fragments de digestion compris entre 50 et 300 bp ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

PCR sans amores (shuffling)

10 1 µg des fragments Aeq digérés ont été soumis à une PCR sans amores dans 50 µl de tampon PCR contenant 200 µM de chaque dNTP, 2,2 mM MgCl₂, 2,5 unités de *taq* polymérase (Qiagen) en effectuant 35 cycles avec 30s à 94°C, 30s à 45°C et 30s à 72°C.

PCR avec amores

15 2,5 µl du produit de la réaction de shuffling a été amplifié par 20 cycles de PCR (30s à 94°C, 30s à 58°C et 40s à 72°C) dans 100 µl de tampon de PCR contenant 20 pmole de chaque amorce up-e-Aeq et lo-e-Aeq, 50 µM de chaque dNTP, 1,5 mM MgCl₂ et 2,5 unités de *taq* polymérase (Qiagen).

Banque de mutants

20 Le produit de la PCR avec amores (aequorines mutées) a été purifié (Qiaquick extraction kit, Qiagen), digéré *Kpn*I / *Eco*RI et sous-cloné dans le vecteur pPD16 sous dépendance du promoteur *Plac*. La banque d'aequorines mutantes a été transformée dans la souche d'*E. Coli* XL1 blue (Stratagene), et étalée sur boites LB ampicilline.

25 Au 1^{er} tour de shuffling-criblage, 15840 colonies ont été repiquées individuellement, transférées en plaques 96 puits (Costar) dans 50 µl de LB ampicilline par puits et incubées 4 h à 37°C avec agitation en vue du criblage de leur activité.

30 Aux 2^e et 3^e tour de shuffling-criblage, respectivement 19200 et 17952 colonies ont été repiquées individuellement, transférées en plaques 96 puits dans 200 µl de milieu de congélation (composition en g/l, Bacto tryptone, 16, Bacto yeast extract, 10, NaCl, 5, K2HPO₄, 0,27, KH₂PO₄, 7,16, Na citrate, 2, MgSO₄-7H₂O, 0,1, (NH₄)₂SO₄, 0,9, glycérol, 50 et 100 µg/ml d'ampicilline) et après incubation sur la nuit à 37°C sans agitation, stockées à -80°C. Ces plaques de stockage ont été répliquées (96 pin replicator long, Genetix) en plaques 96 puits (Costar) dans 50 µl de LB ampicilline par puits. Ces répliques pour criblage ont été incubées 4 h à 37°C avec agitation.

Après ajout de 50 µl par puits d'une solution contenant Tris pH8, 100 mM, NaCl, 90 mM, coelenterazin, 5 mM, les plaques à cribler ont été incubées à 4°C durant la nuit pour la reconstitution de l'aequorine (volume final par puits 100 µl).

Criblage

Après 15 minutes à température ambiante, les clones d'aequorines mutées en plaques 96 puits ont été criblées pour leur activité de bioluminescence activée par le Ca²⁺ à l'aide d'un luminomètre à injecteur (PhL, Mediators, Austria). La lumière émise durant les 4 secondes consécutives à l'injection de 100 µl d'une solution contenant CaCl₂, 20 mM et triton X100, 1% a été mesurée pour chaque clone individuellement. Les mutants ont été sélectionnés sur la base d'une activité 15 fois supérieure à la moyenne des clones de la plaque 96 puits et ré-étalés sur boîte LB ampicilline pour confirmation et comparaison avec l'aequorine sauvage. A l'issue du 1^{er} tour de criblage, 40 clones dont l'activité était supérieure à celle de l'aequorine sauvage ont été sélectionnés pour le 2^e tour de shuffling-criblage. 37 clones ont été sélectionnés au second tour pour le troisième tour de criblage. L'insert de chacun de ces clones a été amplifié individuellement par PCR en utilisant les amorces up-e-Aeq et lo-e-Aeq (voir ci-dessus, DNA shuffling). Les produits de PCR de chaque clone ont été combinés (200 ng par clone) et soumis au protocole de DNA shuffling précédent pour générer la banque de mutants du tour suivant.

20

Séquençage des mutants

Le séquençage des mutants (7 mutants sélectionnés au 2^e tour et 7 mutants sélectionnés au 3^e tour) a été réalisé sur un séquenceur automatique ABI310 (PE applied biosystems) avec les amorces up-e-Aeq et lo-e-Aeq (voir DNA shuffling).

25

Purification des aequorines

Les cDNA de l'aequorine sauvage et des aequorines mutantes, excisés par double coupure *KpnI/EcoRI* ont été sous-clonés dans pRSETC (Invitrogen, Xpress protein expression system). Les plasmides résultants ont été transformés dans la souche d'E.Coli BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) pour expression des aequorines. Les aequorines ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel-agarose (Invitrogen, Xpress protein expression system), selon les instructions du fabricant (élution par 350 mM imidazole). Les aequorines purifiées ont été conservées

à -20°C dans une solution contenant (concentrations finales) imidazole, 175 mM ; EDTA, 10 µM ; BSA, 10 µg/ml et glycérol, 50%.

Expression en lignée cellulaire eucaryote (HEK 293)

5 Les cDNA de l'aequorine sauvage et des aequorines mutantes, excisés par double coupure *KpnI/SpeI* ou *HindIII/SpeI* ont été sous-clonés aux sites *KpnI/NheI* ou *HindIII/NheI* dans un vecteur d'expression eucaryote, pCMX, sous dépendance du promoteur CMV. Les plasmides résultants ont été co-transfектés avec un plasmide 10 contenant le gène LacZ (β -galactosidase) sous dépendance du promoteur RSV dans les cellules HEK 293. 24 h après la transfection les cellules ont été collectées et resuspendues en tampon PBS.

Test d'activité β -galactosidase.

15 Un aliquote de la suspension cellulaire a été utilisé pour la mesure de l'activité β -galactosidase (luminescent β -galactosidase detection kit II, Clontech) en plaque 96 puits afin de normaliser les activités aequorine.

Bioluminescence aequorine.

20 Après ajout de coelenterazine (10 µM final) la suspension cellulaire a été distribuée en plaque 96 puits à raison de 50 µl par puits et incubée 3h à 37°C pour reconstituer l'aequorine. La mesure de l'activité aequorine a été réalisée à l'aide d'un luminomètre à injecteur (PhL, Mediators, Austria). La lumière émise durant les 4 secondes consécutives à l'injection de 100 µl d'une solution contenant CaCl₂, 1,5 mM et triton X100, 0,75% a été mesurée et normalisée par rapport à l'activité β -galactosidase.

25 Tests de stabilité des aequorines

En bactéries

Pour chaque clone d'aequorine à tester, une colonie a été amplifiée dans 5 ml de LB ampicilline et après centrifugation le culot bactérien a été rincé deux fois par 5 ml 30 d'une solution contenant NaCl, 100 mM ; Tris HCl, 50 mM, pH 8 et EGTA, 1 mM. Les bactéries ont été resuspendues dans 500 µl de la même solution contenant 10 µM de coelenterazine et incubées à 4°C durant la nuit. Après ajout de lysozyme (0,8 mg/ml final) et homogénéisation, des aliquotes de 50 µl ont été prélevés pour les test de stabilité.

5 Stabilité à 37°C au cours du temps : les aliquotes ont été incubés à 37°C et à différents temps (jusqu'à 72 h), puis ont été distribués en plaque 96 puits à raison de 10 µl par puits. La luminescence activée par injection de 200 µl d'une solution contenant CaCl₂, 2 mM ; NaCl, 100 mM ; Tris HCl pH 8, 50 mM et EGTA, 1 mM (Ca²⁺ libre, ~1 mM) a été mesurée et normalisée par rapport à la valeur obtenue à t₀.

10 Stabilité à différentes températures : les aliquotes ont été incubés à des températures comprises entre 25 et 55°C durant 30 min puis distribués en plaque 96 puits à raison de 10 µl par puits. La luminescence, mesurée comme ci-dessus, a été normalisée par rapport à la valeur obtenue à 25°C.

15 *Sur protéines purifiées*

20 Les aequorines purifiées ont été reconstituées par dilution 10 dans une solution contenant Tris HCl, 50 mM pH8 ; DTT, 10 mM, EDTA, 1 mM et coelenterazine, 2 µM et incubation 1h à 4°C. Des aliquotes de 50 µl ont ensuite été prélevés pour les test de stabilité. Les mesures de stabilité ont été effectuées comme précédemment, à l'exception de l'étape d'activation réalisée par injection de 100 µl d'une solution contenant CaCl₂, 10 mM ; Tris HCl pH 8, 50 mM et EDTA, 1 mM.

25 **Tests de sensibilité calcique des aequorines**

30 Les aequorines purifiés ont été reconstituées par dilution 10 dans une solution contenant Tris HCl, 50 mM pH8 ; DTT, 10 mM, EDTA, 10 µM et coelenterazine, 2 µM et incubation 1h à 4°C. Les aequorines reconstituées ont été distribuées en plaque 96 puits à raison de 55 µl par puits et activées par 100 µl d'une solution contenant Tris HCl pH 8, 50 mM ; EDTA, 10 µM et des concentrations de Ca²⁺ libres variables (concentrations libres finales après injection : 10⁻⁸ à 10⁻¹ M). Les mesures de luminescence (luminomètre PhL, Mediators) ont été réalisées en mode cinétique (Fast kinetics, Interval 0.1 sec, kinetic points 60). La détermination des courbes de sensibilité calcique a été basée sur les valeurs initiales de luminescence des cinétiques d'émission lumineuse.

35 **B) Obtention de mutants persistants de la photoprotéine aequorine à luminescence prolongée**

Protocoles

La procédure employée a consisté en la réalisation d'une banque de mutants aléatoires d'aequorine générés par la technique de "DNA shuffling" (Stemmer, WPC, 1994). Ces mutants, insérés dans un vecteur d'expression procaryotique ont été transformés dans E.Coli et clonés. Les clones ont été criblés individuellement pour une augmentation de la durée d'émission de la bioluminescence. Les meilleurs mutants ont alors été séquencés. Nous avons répertorié six mutations qui prolongent la bioluminescence de l'aequorine. Lors des test subséquents, nous avons pu montrer que ces mutations n'augmentent pas l'émission totale de lumière de l'aequorine mais ralentissent sa cinétique. Pour ces mutants, les tests montrent une augmentation du temps d'émission de la bioluminescence (de l'ordre de la minute) d'environ un facteur dix en système cellulaire procaryotique ou eucaryotique et sur protéine purifiée, par rapport à l'aequorine sauvage (de l'ordre de la seconde). Des données préliminaires indiquent que certains mutants présenteraient une thermostabilité supérieure à celle de l'aequorine sauvage (expériences réalisées sur protéine purifiée). Tous ces mutants sauf un montrent une importante réduction d'affinité pour le calcium par rapport à l'aequorine sauvage.

20 **DNA shuffling**

Le cDNA de l'aequorine « sauvage » (Aeqwt, ~600 bp) a été sous-cloné aux sites *Kpn*I (5') et *Eco*RI (3') du vecteur pPD16 sous dépendance du promoteur *Plac*. Ce clone a été nommé pPD-Aeqwt. 20 ng du plasmide pPD-Aeqwt a été digéré par *Pst*I et *Eag*I (sites externes à l'insert aequorine dans le polylinker de pPD16) et l'insert Aeqwt amplifié par PCR en utilisant les amores suivantes : up-e-Aeq, 5' CGG GTA CCG ATG CTTTATGATGTTCCCTGAT 3' et lo-e-Aeq, 5' TGGAATTTC TTA GGGGACAGCTCCAC 3'. Le produit de PCR résultant a été purifié (Qiaquick extraction kit, Qiagen). 3 µg du produit purifié a été digéré par la DNaseI (1 ng/µl) dans 100 µl de tampon DNase I à 25°C pendant 7 min. Les fragments de digestion compris entre 50 et 300 bp ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

PCR sans amorces (shuffling)

1 µg des fragments Aeq digérés ont été soumis à une PCR sans amorces dans 50 µl de tampon PCR contenant 200 µM de chaque dNTP, 2,2 mM MgCl₂, 2.5 unités de *taq* polymérase (Qiagen) en effectuant 35 cycles avec 30s à 94°C, 30s à 45°C et 30s à 72°C.

5

PCR avec amorces

2,5 µl du produit de la réaction de shuffling a été amplifié par 20 cycles de PCR (30s à 94°C, 30s à 58°C et 40s à 72°C) dans 100 µl de tampon de PCR contenant 20 pmole de chaque amorce up-e-Aeq et lo-e-Aeq, 50 µM de chaque dNTP, 1,5 mM MgCl₂ et 2.5 unités de *taq* polymérase (Qiagen).

10

Banque de mutants

Le produit de la PCR avec amores (aequorines mutées) a été purifié (Qiaquick extraction kit, Qiagen), digéré *Kpn*I / *Eco*RI et sous-cloné dans le vecteur pPD16 sous dépendance du promoteur Plac. La banque d'aequorines mutantes a été transformée dans la souche d'E. Coli XL1 blue (Stratagene), et étalée sur boites LB ampicilline.

15

15840 colonies ont été repiquées individuellement, transférées en plaques 96 puits (Costar) dans 50 µl de LB ampicilline par puits et incubées 4 h à 37°C avec agitation en vue du criblage de leur activité.

20

Après ajout de 50 µl par puits d'une solution contenant Tris pH8, 100 mM, NaCl, 90 mM, coelenterazin, 5 mM, les plaques à cribler ont été incubées à 4°C durant la nuit pour la reconstitution de l'aequorine (volume final par puits 100 µl).

Criblage

Après 15 minutes à température ambiante, les clones d'aequorines mutées en plaques 96 puits ont été criblées pour leur activité de bioluminescence activée par le Ca²⁺ à l'aide d'un luminomètre à injecteur (PhL, Mediators, Austria). La lumière émise durant les 4 secondes consécutives (t0-4) à l'injection de 100 µl d'une solution contenant CaCl₂, 20 mM et triton X100, 1%, et durant les 4 secondes suivantes (t4-8) a été mesurée pour chaque clone individuellement. Les mutants ayant un rapport t0-4/t4-8 inférieur à 1.5 ont été sélectionnés et réétalés sur boite LB ampicilline pour confirmation et détermination des meilleurs mutants.

30

Séquençage des mutants

Le séquençage des mutants (20 mutants séquencés) a été réalisé sur un séquenceur automatique ABI310 (PE applied biosystems) avec les amorces up-e-Aeq et lo-e-Aeq (voir DNA shuffling).

5

Purification des aequorines

Les cDNA de l'aequorine sauvage et des aequorines mutantes, excisés par double coupure *KpnI/EcoRI* ont été sous-clonés dans pRSETC (Invitrogen, Xpress protein expression system). Les plasmides résultants ont été transformés dans la souche d'E.Coli BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) pour expression des aequorines. Les aequorines ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel-agarose (Invitrogen, Xpress protein expression system), selon les instructions du fabricant (élution par 350 mM imidazole). Les aequorines purifiées ont été conservées à -20°C dans une solution contenant (concentrations finales) imidazole, 175 mM ; EDTA, 10 µM ; BSA, 10 µg/ml et glycérol, 50%.

10

15

Expression en lignée cellulaire eucaryote (HEK 293)

Les cDNA de l'aequorine sauvage et des aequorines mutantes, excisés par double coupure *KpnI/SpeI* ou *HindIII/SpeI* ont été sous-clonés aux sites *KpnI/NheI* ou *HindIII/NheI* dans un vecteur d'expression eucaryote, pCMX, sous dépendance du promoteur CMV. Les plasmides résultants ont été transfectés dans les cellules HEK 293. 24 h après la transfection les cellules ont été collectées et resuspendues en tampon PBS.

20

25

30

Après ajout de coelenterazine (10 µM final) la suspension cellulaire a été distribuée en plaque 96 trous à raison de 50 µl par trou et incubée 3h à 37°C pour reconstituer l'aequorine. La mesure de l'activité aequorine a été réalisée à l'aide d'un luminomètre à injecteur (PhL, Mediators, Austria). Les cinétiques d'émission de la bioluminescence consécutives à l'injection de 100 µl d'une solution contenant CaCl₂, 1,5 mM et triton X100, 0,75% ont été déterminées en mode cinétique (Fast kinetics, Interval 0.1-10 sec, kinetic points 60).

Tests de cinétique de bioluminescence et de sensibilité calcique des aequorines***En bactéries***

Pour chaque clone d'aequorine à tester, une colonie a été amplifiée dans 5 ml de LB ampicilline et après centrifugation le culot bactérien a été rincé deux fois par 5 ml d'une solution contenant NaCl, 100 mM ; Tris HCl, 50 mM, pH 8 et EGTA, 1 mM. Les bactéries ont été resuspendues dans 500 µl de la même solution contenant 10 µM de coelenterazine et incubées à 4°C durant la nuit. Après ajout de lysozyme (0,8 mg/ml final) et homogénéisation, des aliquotes de 50 µl ont été prélevés pour les test de cinétique et/ou de sensibilité calcique comme décrit ci-dessous.

10 *Sur protéines purifiées*

Les aequorines purifiées ont été reconstituées par dilution 10 dans une solution contenant Tris HCl, 50 mM pH8 ; DTT, 10 mM, EDTA, 10 µM et coelenterazine, 2 µM et incubation 1h à 4°C. Les aequorines reconstituées ont été distribuées en plaque 96 puits à raison de 55 µl par puits et activées par 100 µl d'une solution contenant Tris HCl pH 8, 50 mM ; EDTA, 10 µM et des concentrations de Ca²⁺ libres variables (concentrations libres finales après injection : 10⁻⁸ à 10⁻¹ M). Les mesures de luminescence (luminomètre PhL, Mediators) ont été réalisées en mode cinétique (Fast kinetics, Interval 0.1-10 sec, kinetic points 60). La détermination des courbes de sensibilité calcique a été basée sur les valeurs initiales de luminescence des cinétiques d'émission lumineuse.

C) Applications industrielles des mutants de la photoprotéine aequorine**1) Détection *in vitro* de molécules organiques (acides nucléiques, protéines, antigènes etc.)**

25 Ces tests de détection sont basés sur l'immobilisation de la molécule à détecter et sur la fixation spécifique de la photoprotéine à cette molécule. L'immobilisation et la fixation spécifique sont réalisées par des moyens très divers en fonction du type de molécule à détecter et du type d'échantillon à analyser. La quantité de la molécule à détecter dans l'échantillon est ensuite déterminée par activation de la photoprotéine fixée et mesure de la bioluminescence émise.

a) Détection d'acides nucléiques

La détection de séquences d'acides nucléiques peut être réalisée, soit après une étape d'amplification par PCR (ADN) ou RT-PCR (ARN) ou par toute autre technique d'amplification d'acides nucléiques, soit directement. Après immobilisation des molécules d'acides nucléiques ou de leurs produits d'amplification, les molécules sont détectées par hybridation d'une sonde. L'hybridation de la sonde est ensuite révélée grâce à une photoprotéine couplée directement à la sonde ou liée de façon subséquente à celle-ci. Les molécules d'acides nucléiques ou de leurs produits d'amplification sont quantifiées par l'intensité de la bioluminescence émise.

Les principales références bibliographiques décrivant de tels procédés sont les suivantes :

- 1- Lewis JC, Daunert S. Photoproteins as luminescent labels in binding assays. Fresenius J Anal Chem. 2000 Mar-Apr;366(6-7):760-8
- 2- Coombes BK, Mahony JB. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) of Chlamydia pneumoniae major outer membrane protein (ompA) mRNA with bioluminescent detection. Comb Chem High Throughput Screen. 2000 Aug;3(4):315-27.
- 3- Laios E, Ioannou PC, Christopoulos TK. Enzyme-amplified aequorin-based bioluminometric hybridization assays. Anal Chem. 2001 Feb 1;73(3):689-92.
- 4- Actor JK. Bioluminescent quantitation and detection of gene expression during infectious disease. Comb Chem High Throughput Screen. 2000 Aug;3(4):273-88.
- 5- White SR, Christopoulos TK. Signal amplification system for DNA hybridization assays based on in vitro expression of a DNA label encoding apoaequorin. Nucleic Acids Res. 1999 Oct 1;27(19):e25.
- 6- Guenthner PC, Hart CE. Quantitative, competitive PCR assay for HIV-1 using a microplate-based detection system. Biotechniques. 1998 May;24(5):810-6.

b) Détection de protéines ou d'antigènes

Après immobilisation, les protéines et antigènes sont détectés par association spécifique avec une sonde (association du type antigène-anticorps ou ligand-récepteur). La fixation de la sonde est ensuite révélée grâce à une photoprotéine couplée directement à la sonde ou liée de façon subséquente à celle-ci. Les molécules de protéines ou d'antigènes sont quantifiées par l'intensité de la bioluminescence émise.

Les principales références bibliographiques décrivant de tels procédés sont les suivantes :

1-Jackson RJ, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR. Luminometry: a novel bioluminescent immunoassay enhances the quantitation of mucosal and systemic antibody responses. *J Immunol Methods.* 1996 Apr 19;190(2):189-97.

5 2-Mattox S, Walrath K, Ceiler D, Smith DF, Cummings RD. A solid-phase assay for the activity of CMPNeuAc:Gal beta 1-4GlcNAc-R alpha-2,6-sialyltransferase. *Anal Biochem.* 1992 Nov 1;206(2):430-6.

10 2) Détections d'activités enzymatiques

Des substrats protéiques composés en partie d'une photoprotéine (type protéine de fusion) peuvent permettre de mesurer des activités enzymatiques *in vitro* ou en systèmes cellulaires. Les activités enzymatiques détectables sont, par exemple, du type 15 « modification de protéines » (protéases, kinases, glycosylases, etc.). Ce type de mesure peut servir au criblage de molécules activant ou inhibant une activité enzymatique spécifique (par exemple en référence 1, détection de l'activité de la protéase d'HIV-1).

Pour les mesures *in vitro*, le substrat protéique contenant la photoprotéine, ou 20 l'échantillon à doser, sont immobilisés. L'activité enzymatique est ensuite quantifiée par l'intensité de la bioluminescence émise. Le même type de mesure peut être réalisé en systèmes cellulaires exprimant le gène correspondant au substrat protéique contenant la photoprotéine. Les activités enzymatiques cellulaires sont alors quantifiées par activation de la photoprotéine et mesure de l'intensité de la bioluminescence émise.

Un tel procédé est décrit notamment dans Deo SK, Lewis JC, Daunert S. 25 Bioluminescence detection of proteolytic bond cleavage by using recombinant aequorin. *Anal Biochem.* 2000 May 15;281(1):87-94.

3) Détection des variations de calcium intracellulaire en systèmes cellulaires.

30 Les photoprotéines de type aequorine exprimées en lignées cellulaires (procaryotiques ou eucaryotiques) permettent de détecter les variations de calcium intracellulaire induites par divers agents. Les variations de calcium intracellulaire sont détectées par les variations correspondantes de la bioluminescence émise. L'application la plus courante utilise des lignées eucaryotes du type HEK 293 co-exprimant

l'aequorine et un récepteur de neurotransmetteur (récepteur-canal ou récepteur couplé à une protéine G) pour cibler des agents pharmacologiques ou des ligands naturels agissant sur le récepteur. Inversement, ces systèmes peuvent être utilisés pour cibler des banques d'ADN à la recherche des récepteurs activés par un agent pharmacologique ou un ligand naturel. Le cible est basé sur la variation de bioluminescence induite par l'application de l'agent pharmacologique ou du ligand naturel.

5

Les principales références bibliographiques décrivant de tels procédés sont les suivantes :

10 1- Button D, Brownstein M. Aequorin-expressing mammalian cell lines used to report Ca²⁺ mobilization. *Cell Calcium*. 1993 Oct;14(9):663-71.

2- Ungrin MD, Singh LM, Stocco R, Sas DE, Abramovitz M. An automated aequorin luminescence-based functional calcium assay for G-protein-coupled receptors. *Anal Biochem*. 1999 Jul 15;272(1):34-42.

15

3- Schaeffer MT, Cully D, Chou M, Liu J, Van der Ploeg LH, Fong TM. Use of bioluminescent aequorin for the pharmacological characterization of 5HT receptors. *J Recept Signal Transduct Res*. 1999 Nov;19(6):927-38.

20

4- George SE, Schaeffer MT, Cully D, Beer MS, McAllister G. A high-throughput glow-type aequorin assay for measuring receptor-mediated changes in intracellular calcium levels. *Anal Biochem*. 2000 Nov 15;286(2):231-7.

5- Parnot C, Bardin S, Miserey-Lenkei S, Guedin D, Corvol P, Clauser E. Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 20;97(13):7615-20.

25

6- Kotani M, Mollereau C, Detheux M, Le Poul E, Brezillon S, Vakili J, Mazarguil H, Vassart G, Zajac JM, Parmentier M. Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides. *Br J Pharmacol*. 2001 May 1;133(1):138-144.

REVENDICATIONS

5 1. Utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation de photoprotéines mutées ayant une thermostabilité supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, encore désignées photoprotéines mutées thermostables, et/ou par un temps de luminescence supérieur à celui des photoprotéines dont elles dérivent, encore désignées photoprotéines mutées persistantes, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées en ce que leur stabilité dans le temps est augmentée à 37°C d'un facteur d'au moins environ 10, et/ou en ce que leur temps de luminescence est augmenté d'un facteur d'au moins environ 10, par rapport aux photoprotéines dont elles dérivent

10 2. Procédé de préparation de photoprotéines mutées thermostables, et/ou persistantes, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées en ce que leur stabilité dans le temps est augmentée à 37°C d'un facteur d'au moins environ 10, et/ou en ce que leur temps de luminescence est augmenté d'un facteur d'au moins environ 10, par rapport aux photoprotéines de méduse dont elles dérivent, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre d'une ou plusieurs mutations desdites photoprotéines de méduse, lesdites mutations étant choisies parmi :

15 * au moins une des trois mutations augmentant la thermostabilité desdites photoprotéines, et choisie parmi les suivantes :

20 - suppression de la lysine (K) contenue dans le motif RH₁X₂MFX₂ dans lequel X₁=H ou F, et X₂= N ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette lysine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette lysine par une arginine,

25 - suppression de la glutamine (Q) contenue dans le motif DEMTRQHLGF_Y, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette glutamine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette glutamine par une arginine,

30 - suppression de la leucine (L) contenue dans le motif DEMTRQHLGF_Y susmentionné, ou substitution de cette leucine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette leucine par une isoleucine,

* et/ou au moins une des six mutations augmentant le temps de luminescence desdites photoprotéines, et choisie parmi les suivantes :

- suppression du glutamate (E) contenu dans le motif $DX_1NX_2X_3GX_4IX_5LX_6E$ dans lequel $X_1=V$ ou I, $X_2=H$, G ou S, $X_3=N$ ou D, $X_4=K$ ou Q, $X_5=S$, T ou N, et $X_6=D$ ou N, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif $DKDX_1X_2GX_3X_4X_5LDE$ dans lequel $X_1=Q$, G ou R, $X_2=N$ ou S, $X_3=A$, S ou T, $X_4=I$ ou V, et $X_5=T$ ou S, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression du glutamate (E) contenu dans le motif $DKDX_1X_2GX_3X_4X_5LDE$ susmentionné, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression de la phénylalanine (F) contenue dans le motif $EX_1TFX_2X_3$ dans lequel $X_1=E$, K ou A, $X_2=R$, K ou A, et $X_3=V$ ou H, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette phénylalanine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette phénylalanine par une sérine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif $DX_1DX_2X_3GX_4LDVDE$, dans lequel $X_1=I$ ou L, $X_2=E$, N ou G, $X_3=S$ ou D, et $X_4=Q$, K ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression de la valine en position 54 de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 de l'aequorine, ou substitution de cette valine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette valine par une alanine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine.

3. Photoprotéines mutées dérivées des photoprotéines isolées de méduses, caractérisées en ce que leur stabilité dans le temps est augmentée à 37°C d'un facteur d'au moins environ 10, et/ou en ce que leur temps de luminescence est augmenté d'un facteur d'au moins environ 10, par rapport aux photoprotéines dont elles dérivent.

5

4. Photoprotéines mutées selon la revendication 3, caractérisées en ce qu'elles sont stables pendant au moins environ 30 minutes jusqu'à la température d'environ 50°C, et en ce qu'elles peuvent être conservées pendant au moins environ 4 jours à des températures pouvant atteindre jusqu'à 37°C, et/ou en ce que leur temps de luminescence est compris entre environ 1 min et environ 5 min.

10

5. Photoprotéines mutées selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisées en ce qu'elles comprennent

15

* au moins une des trois mutations augmentant leur thermostabilité, choisie parmi les suivantes :

- suppression de la lysine (K) contenue dans le motif RH_{X₁}X₁MFX₂ dans lequel X₁=H ou F, et X₂= N ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette lysine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette lysine par une arginine,

20

- suppression de la glutamine (Q) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette glutamine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette glutamine par une arginine,

25

- suppression de la leucine (L) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY susmentionné, ou substitution de cette leucine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette leucine par une isoleucine,

* et/ou au moins une des six mutations augmentant leur temps de luminescence, choisie parmi les suivantes :

30

- suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DX₁NX₂X₃GX₄IX₅LX₆E dans lequel X₁=V ou I, X₂=H, G ou S, X₃=N ou D, X₄=K ou Q, X₅=S, T ou N, et X₆=D ou N, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

- suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif $DKDX_1X_2GX_3X_4X_5LDE$ dans lequel $X_1=Q, G$ ou R , $X_2=N$ ou S , $X_3=A$, S ou T , $X_4=I$ ou V , et $X_5=T$ ou S , ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression du glutamate (E) contenu dans le motif $DKDX_1X_2GX_3X_4X_5LDE$ susmentionné, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression de la phénylalanine (F) contenue dans le motif $EX_1TFX_2X_3$ dans lequel $X_1=E, K$ ou A , $X_2=R, K$ ou A , et $X_3=V$ ou H , ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette phénylalanine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette phénylalanine par une sérine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif $DX_1DX_2X_3GX_4LDVDE$, dans lequel $X_1=I$ ou L , $X_2=E, N$ ou G , $X_3=S$ ou D , et $X_4=Q, K$ ou D , ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,
- suppression de la valine en position 54 de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 de laequorine, ou substitution de cette valine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette valine par une alanine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine.

6. Photoprotéines mutées thermostables selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une des deux mutations suivantes :

- suppression de la glutamine contenue dans le motif $DEMTRQHLGFWY$, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette glutamine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette glutamine par une arginine,

- suppression de la leucine contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY susmentionné, ou substitution de cette leucine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette leucine par une isoleucine.

5

7. Photoprotéines mutées persistantes selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une des mutations suivantes :

10

- suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE dans lequel X₁=Q, G ou R, X₂=N ou S, X₃=A, S ou T, X₄=I ou V, et X₅=T ou S, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

15

- suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DKDX₁X₂GX₃X₄X₅LDE susmentionné, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine,

20

- suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DX₁DX₂X₃GX₄LDVDE, dans lequel X₁=I ou L, X₂=E, N ou G, X₃=S ou D, et X₄=Q, K ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine.

25

8. Photoprotéines mutées selon l'une des revendications 3 à 7, caractérisées en ce qu'elles dérivent de l'aequorine (SEQ ID NO : 2), de la clytine (SEQ ID NO : 18), de la mitrocomine (SEQ ID NO : 34), et de l'obéline (SEQ ID NO : 50).

30

9. Photoprotéines mutées thermostables selon la revendication 8, choisies parmi :

- les protéines dérivées de l'aequorine comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16,
- les protéines dérivées de la clytine comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32,

- les protéines de la mitrocomine comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48,
- les protéines dérivées de l'obéline comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64.

5

10. Photoprotéines mutées persistantes selon la revendication 8, choisies parmi :

- les protéines dérivées de l'aequorine comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 66, 68, 70, 72, 74, 76,
- les protéines dérivées de la clytine comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 78, 80, 82, 84, et 86,
- les protéines de la mitrocomine comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 88, 90, 92, 94, et 96,
- les protéines dérivées de l'obéline comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO : 98, 100, 102, 104, et 106.

10

11. Photoprotéines mutées thermostables et persistantes selon la revendication 8, choisies parmi :

- les protéines dérivées de l'aequorine de séquences SEQ ID NO : 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, et correspondant aux séquences SEQ ID NO : 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, dans lesquelles E en position 45 est remplacé par G, et/ou V en position 54 est remplacé par A, et/ou D en position 127 est remplacé par G, et/ou E en position 138 est remplacé par G, et/ou F en position 159 est remplacé par S, et/ou D en position 163 est remplacé par G,
- les protéines dérivées de la clytine de séquences SEQ ID NO : 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, et correspondant aux séquences suivantes : SEQ ID NO : 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, dans lesquelles E en position 44 est remplacé par G, et/ou D en position 126 est remplacé par G, et/ou E en position 137 est remplacé par G, et/ou F en position 158 est remplacé par S, et/ou D en position 162 est remplacé par G,
- les protéines de la mitrocomine de séquences SEQ ID NO : 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, et correspondant aux séquences suivantes : SEQ ID NO : 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, dans lesquelles E en position 43 est remplacé par G, et/ou D en position 125 est remplacé par G, et/ou E en position 136 est remplacé par G, et/ou F en position 157 est remplacé par S, et/ou D en position 161 est remplacé par G,

15

20

25

30

5 - les protéines dérivées de l'obéline de séquences SEQ ID NO : 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, et correspondant aux séquences suivantes : SEQ ID NO : 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, dans lesquelles E en position 41 est remplacé par G, et/ou D en position 123 est remplacé par G, et/ou E en position 134 est remplacé par G, et/ou F en position 155 est remplacé par S, et/ou D en position 159 est remplacé par G.

12. Photoprotéines mutées selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisées en ce qu'elles sont liées :

- 10 - à une sonde protéique ou nucléique susceptible de reconnaître des antigènes ou protéines ou acides nucléiques déterminés,
- ou à un substrat spécifique d'une activité enzymatique déterminée,
- ou à une molécule susceptible de former un complexe avec une autre molécule, tel que le complexe avidine-biotine.

15 13. Séquences nucléotidiques codant pour les photoprotéines mutées selon l'une des revendications 3 à 12.

20 14. Séquences nucléotidiques selon la revendication 13, codant pour les photoprotéines mutées selon les revendications 9 à 11, choisies parmi les acides nucléiques comprenant les séquences SEQ ID NO : 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, ou toute séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique des séquences susmentionnées et codant pour les photoprotéines mutées selon les revendications 9 à 11.

25 15. Vecteur, tel qu'un plasmide, contenant une séquence recombinante comprenant une séquence nucléotidique selon la revendication 13 ou 14.

30 16. Cellules hôtes, telles que cellules procaryotes, notamment *E. coli*, ou eucaryotes, notamment les lignées HEK 293, ou CHO, transformées par un vecteur selon la revendication 15.

17. Procédé de préparation de photoprotéines mutées selon l'une des revendications 3 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend l'utilisation d'un vecteur selon la revendication 15 capable de produire lesdites photoprotéines, ou la transformation de cellules hôtes appropriées à l'aide d'un vecteur susmentionné, la mise en culture de cellules hôtes transformées selon la revendication 16 ainsi obtenues dans un milieu approprié, et la récupération, le cas échéant après purification, des photoprotéines mutées produites par ces cellules.

18. Utilisation de photoprotéines mutées selon l'une des revendications 3 à 12, ou de cellules hôtes transformées selon la revendication 16 exprimant lesdites photoprotéines mutées, dans le cadre de la mise en œuvre :

- de procédés de détection *in vitro* de molécules, tels que des protéines ou antigènes ou des acides nucléiques dans un échantillon biologique, notamment dans le cadre du dépistage *in vitro* de bactéries telles que les *Listeria* dans les aliments, ou dans le cadre du dépistage d'agents pathogènes tels que le virus VIH chez l'homme,
- de procédés de détection de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique, notamment dans le cadre du criblage de molécules activant ou inhibant une activité enzymatique spécifique,
- de procédés de détection des variations de calcium intracellulaire induites par divers agents, notamment dans le cadre du criblage de molécules agissant sur une séquence nucléique ou protéique fusionnée à la photoprotéine mutée, ou coexprimée avec la photoprotéine mutée dans des cellules hôtes susmentionnées.

19. Procédés de détection *in vitro* de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques dans un échantillon biologique, tels que définis dans la revendication 18, caractérisés en ce qu'ils comprennent principalement les étapes suivantes :

- le cas échéant, une étape d'amplification du nombre d'acides nucléiques présents dans l'échantillon biologique,
- immobilisation des protéines ou antigènes ou acides nucléiques sur un support approprié, puis addition d'une sonde spécifique desdits protéines ou antigènes ou acides nucléiques et rinçage, ladite sonde étant liée à une photoprotéine selon la revendication 12, ou ladite photoprotéine étant additionnée sur le support avec les réactifs appropriés pour sa liaison à ladite sonde,
- mesure de l'intensité de la bioluminescence émise après l'étape de rinçage.

20. Procédés de détection *in vitro* de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique tels que définis dans la revendication 18, caractérisés en ce qu'ils comprennent principalement les étapes suivantes :

- 5 - immobilisation sur un support approprié d'un substrat protéique spécifique de l'activité enzymatique à détecter, ce substrat étant lié à une photoprotéine selon la revendication 12, addition de l'échantillon biologique, puis rinçage,
- 10 - ou immobilisation sur un support approprié des composés de l'échantillon biologique, addition du substrat protéique lié à une photoprotéine selon la revendication 12, puis rinçage,
- mesure de l'intensité de la bioluminescence émise après l'étape de rinçage.

15 21. Procédés de détection *in vitro* des variations de calcium intracellulaire induites par divers agents tels que définis dans la revendication 18, caractérisés en ce qu'il comprend la mise en culture de cellules transformées selon la revendication 16, avec l'échantillon contenant les molécules à détecter, et la mesure de la variation de bioluminescence.

20 22. Procédés selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisés en ce qu'ils peuvent être effectués jusqu'à des températures d'environ 50 °C, à l'aide de photoprotéines thermostables, et, le cas échéant, persistantes, selon l'une des revendications 3 à 12.

25 23. Procédés selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisés en ce qu'ils peuvent être effectués en simultanés sur échantillons multiples, à l'aide de photoprotéines persistantes, et, le cas échéant, thermostables, selon l'une des revendications 3 à 12.

30 24. Kits pour la mise en œuvre de procédés selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisés en ce qu'ils comprennent des photoprotéines mutées selon l'une des revendications 3 à 12, le cas échéant en association avec des réactifs nécessaires à la mise en œuvre desdits procédés.

25. Kits selon la revendication 24, caractérisés en ce qu'ils peuvent être conservés en solutions prêtes à l'emploi, notamment pendant au moins 4 jours à des températures ambiantes d'environ 20°C et pouvant atteindre jusqu'à environ 37°C, lorsqu'ils contiennent des photoprotéines thermostables, et, le cas échéant, persistantes, selon 5 l'une des revendications 3 à 12.

SEQUENCE LISTING

<110> CNRS

<120> PHOTOPROTEINES MUTEES ET LEURS APPLICATIONS

<130> IFB 01 AJ CNR MEDU

<140> FR 01 09293

<141> 2001-07-12

<160> 134

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 600

<212> DNA

<213> Aequorea victoria

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(600)

<223>

<400> 1

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac	48
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc	96
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac	144
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa	192
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga	240
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg	288
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca	336
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa	384
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115	120
	125
gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa	432
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys	
130	135
	140
gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga	480
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145	150
	155
	160
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca	528
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165	170
	175
aga caa cat tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag	576
Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys	
180	185
	190
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa	600
Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro	
195	

<210> 2

<211> 199

<212> PRT

<213> Aequorea victoria

<400> 2

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1	5
	10
	15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe	
20	25
	30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35	40
	45

Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50	55
	60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65	70
	75
	80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85	90
	95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100	105
	110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115	120
	125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
 130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg
 145 150 155 160

Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
 165 170 175

Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 3

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(600)

<223>

<400> 3

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac	48
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac agg cat atg ttc aat ttc	96
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac	144
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa	192
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc gga gga gct gga	240
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg	288
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca	336
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys 115 120 125	384
gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140	432
gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	480
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	528
aga caa cat tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 180 185 190	576
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 195	600

<210> 4

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 4

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp 1 5 10 15
--

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe 20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr 35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln 50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly 65 70 75 80
--

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp 85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro 100 105 110
--

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys 115 120 125
--

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140
--

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg
 145 150 155 160

Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
 165 170 175

Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 5

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(600)

<223>

<400> 5

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac
 Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
 1 5 10 15

48

tgc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc
 Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
 20 25 30

96

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac
 Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr
 35 40 45

144

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa
 Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
 50 55 60

192

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga
 Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
 65 70 75 80

240

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg
 Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
 85 90 95

288

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca
 Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
 100 105 110

336

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa
 Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys
 115 120 125

384

gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa
 Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 432
 130 135 140

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga
 Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 480
 145 150 155 160

gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca
 Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 528
 165 170 175

aga cga cat tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag
 Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 576
 180 185 190

ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa
 Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 600
 195

<210> 6

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 6

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
 1 5 10 15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
 20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr
 35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
 50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
 65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
 85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
 100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys
 115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
 130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg
 145 150 155 160

Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
 165 170 175

Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 7

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(600)

<223>

<400> 7

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac	48
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc	96
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac	144
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa	192
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga	240
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg	288
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca	336
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa	384
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115 120 125	

gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140	432
gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	480
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	528
aga caa cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 180 185 190	576
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 195	600

<210> 8

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 8

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp 1 5 10 15
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe 20 25 30
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr 35 40 45
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln 50 55 60
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly 65 70 75 80
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp 85 90 95
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro 100 105 110
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys 115 120 125
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160

Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
165 170 175

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 9

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (600)

<223>

<400> 9

Met	Leu	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Ser	Asp	1	5	10	15
ttc	gac	aac	cca	aga	tgg	att	gga	cga	cac	agg	cat	atg	ttc	aat	ttc	20	25	30	96
Phe	Asp	Asn	Pro	Arg	Trp	Ile	Gly	Arg	His	Arg	His	Met	Phe	Asn	Phe				
ctt	gat	gtc	aac	cac	aat	gga	aaa	atc	tct	ctt	gac	gag	atg	gtc	tac	35	40	45	144
Leu	Asp	Val	Asn	His	Asn	Gly	Lys	Ile	Ser	Leu	Asp	Glu	Met	Val	Tyr				
aag	gca	tct	gat	att	gtc	atc	aat	aac	ctt	gga	gca	aca	cct	gag	caa	50	55	60	192
Lys	Ala	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Asn	Leu	Gly	Ala	Thr	Pro	Glu	Gln				
gcc	aaa	cga	cac	aaa	gat	gct	gta	gaa	gcc	ttc	ttc	gga	gga	gct	gga	65	70	75	240
Ala	Lys	Arg	His	Lys	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	Phe	Phe	Gly	Gly	Ala	Gly				
atg	aaa	tat	ggt	gtg	gaa	act	gat	tgg	cct	gca	tat	att	gaa	gga	tgg	85	90	95	288
Met	Lys	Tyr	Gly	Val	Glu	Thr	Asp	Trp	Pro	Ala	Tyr	Ile	Glu	Gly	Trp				
aaa	aaa	ttg	gct	act	gat	gaa	ttg	gag	aaa	tac	gcc	aaa	aac	gaa	cca	100	105	110	336
Lys	Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Glu	Leu	Glu	Lys	Tyr	Ala	Lys	Asn	Glu	Pro				
acg	ctc	atc	cgt	ata	tgg	ggt	gat	gct	ttg	ttt	gat	atc	gtt	gac	aaa	115	120	125	384
Thr	Leu	Ile	Arg	Ile	Trp	Gly	Asp	Ala	Leu	Phe	Asp	Ile	Val	Asp	Lys				
gat	caa	aat	gga	gcc	att	aca	ctg	gat	gaa	tgg	aaa	gca	tac	acc	aaa	130	135	140	432
Asp	Gln	Asn	Gly	Ala	Ile	Thr	Leu	Asp	Glu	Trp	Lys	Ala	Tyr	Thr	Lys				

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga	480
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145 150 155 160	
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca	528
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gin Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	
aga cga cat tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag	576
Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys	
180 185 190	
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa	600
Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro	
195	

<210> 10

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 10

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys	
130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	

Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 11

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(600)

<223>

<400> 11

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac	48
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac agg cat atg ttc aat ttc	96
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac	144
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa	192
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga	240
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg	288
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca	336
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa	384
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115 120 125	

gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa	432
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys	
130 135 140	

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga	480
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145 150 155 160	
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca	528
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	
aga caa cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag	576
Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys	
180 185 190	
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa	600
Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro	
195	

<210> 12

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 12

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys	
130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 13

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (600)

<223>

<400> 13

```

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
   1           5           10          15

```

48

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc
 Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
 20 25 30

96

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac
 Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr
 35 40 45

144

```

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
      50          55          60

```

192

```

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65          70          75          .          80

```

240

```

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
          85           90           95

```

288

```

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
          100           105           110

```

336

```

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys
           115          120          125

```

384

gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa
 Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
 130 135 140

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	480
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	528
aga cga cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag Arg Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 180 185 190	576
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 195	600

<210> 14

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 14

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp 1 5 10 15
--

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe 20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr 35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln 50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly 65 70 75 80
--

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp 85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro 100 105 110
--

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys 115 120 125
--

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140
--

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160
--

Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175
--

Arg Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 15

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (600)

<223>

<400> 15

```

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1           5           10          15

```

48

```

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac agg cat atg ttc aat ttc
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe
20          25          30

```

96

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac
 Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr
 35 40 45

144

```

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
      50           55           60

```

192

```

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65      70      75      80

```

240

```

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
          85           90           95

```

288

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

336

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys
115 120 125

384

```

gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
    130          135          140

```

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga	480
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145 150 155 160	
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca	528
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	
aga cga cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag	576
Arg Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys	
180 185 190	
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa	600
Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro	
195	
<210> 16	
<211> 199	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine	
<400> 16	
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	Met
1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe	Asp
20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	Tyr
35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	Ser
50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	Asp
65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	Asp
85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	Trp
100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	Asp
115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys	Asp
130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	Gln
145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	Asp
165 170 175	

Arg Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 17

<211> 597

<212> DNA

<213> Clytia gregaria

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(597)

<223>

<400> 17

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc	48
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe	
1 5 10 15	

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg	96
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu	
20 25 30	

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa	144
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys	
35 40 45	

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc	192
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr	
50 55 60	

aaa cgt cac cag gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg	240
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met	
65 70 75 80	

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa	288
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys	
85 90 95	

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct	336
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser	
100 105 110	

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac	384
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp	
115 120 125	

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc	432
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile	
130 135 140	

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat	480
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His	
145 150 155 160	
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga	528
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg	
165 170 175	
caa cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt	576
Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu	
180 185 190	
tac ggc aat ttt gtt cct taa	597
Tyr Gly Asn Phe Val Pro	
195	

<210> 18

<211> 198

<212> PRT

<213> Clytia gregaria

<400> 18

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe	
1 5 10 15	

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu	
20 25 30	

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys	
35 40 45	

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr	
50 55 60	

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met	
65 70 75 80	

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys	
85 90 95	

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser	
100 105 110	

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp	
115 120 125	

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile	
130 135 140	

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His	
145 150 155 160	

Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg	
165 170 175	

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 19

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 19

48

```

gac aac cca aaa tgg gtc aac arg aga cac aga ttt atg ttc aac ttt ttg
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu
          20           25           30

```

96

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
35 40 45

144

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

192

240

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

288

```

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
          100           105           110

```

336

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125

384

```

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
    130           135           140

```

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
caa cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597

<210> 20

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 20

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met 65 70 75 80
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 21

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 21

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttg
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1          5                  10                         15

```

48

```

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
          20           25           30

```

96

```

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
      35           40           45

```

144

```

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
      50           55           60

```

192

```

aaa cgt cac cag gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65           70           75           ;           80

```

240

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

288

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

336

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
115 120 125

384

22

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
cga cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597
 <210> 22	
 <211> 198	
 <212> PRT	
 <213> séquence dérivée par mutation de la clytine	
 <400> 22	
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15	
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30	
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45	
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60	
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met 65 70 75 80	
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95	
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110	
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125	
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140	
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	

Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 23

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 23

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttg
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
   1           5           10          15

```

48

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg		
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu		
20	25	30

96

```

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
      35          40          45

```

144

```

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
      50          55          60

```

192

aaa cgt cac cag gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 : 80

240

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

288

```

gaa ctg gcc  aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
          100           105           110

```

336

```

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
          115           120           125

```

384

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat	480
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His	
145 150 155 160	
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga	528
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg	
165 170 175	
caa cat ata gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt	576
Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu	
180 185 190	
tac ggc aat ttt gtt cct taa	597
Tyr Gly Asn Phe Val Pro	
195	

<210> 24

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 24

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe	
1 5 10 15	
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu	
20 25 30	
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys	
35 40 45	
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr	
50 55 60	
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met	
65 70 75 80	
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys	
85 90 95	
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser	
100 105 110	
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp	
115 120 125	
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile	
130 135 140	
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His	
145 150 155 160	
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg	
165 170 175	

Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 25

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 25

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
   1           5           10          15

```

48

```

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aga ttt atg ttc aac ttt ttg
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu
          20           25           30

```

96

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa
 Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
 35 40 45

144

```

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
      50           55           60

```

192

```

aaa cgt cac caa gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65           70           75           :   80

```

240

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

288

```

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
          100           105           110

```

336

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125

384

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
cga cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597

<210> 26	
<211> 198	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de la clytine	
<400> 26	
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15	
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30	
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45	
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60	
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met 65 70 75 80	
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95	
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110	
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125	
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140	
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	

Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 27

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(597)

<223>

<400> 27

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc	48
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe	
1 5 10 15	

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aga ttt atg ttc aac ttt ttg	96
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu	
20 25 30	

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa	144
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys	
35 40 45	

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc	192
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr	
50 55 60	

aaa cgt cac cag gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg	240
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Ile Gly Met	
65 70 75 80	

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa	288
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys	
85 90 95	

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct	336
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser	
100 105 110	

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac	384
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp	
115 120 125	

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc	432
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile	
130 135 140	

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
caa cat ata gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597
 <210> 28	
 <211> 198	
 <212> PRT	
 <213> séquence dérivée par mutation de la clytine	
 <400> 28	
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15	
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30	
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45	
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60	
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met 65 70 75 80	
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95	
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110	
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125	
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140	
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	

Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 29

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 29

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1           5                   10                  15

```

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg 96
 Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
 20 25 30

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa 144
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
35 40 45

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc 192
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

aaa cgt cac caa gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg 240
 Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
 65 70 75 80

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa 288
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct 336
 Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac 384
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125

```

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc      432
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
    130          135          140

```

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
cga cat ata gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597

<210> 30

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 30

```

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
   1           5           10          15

```

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
115 120 125

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His
145 150 155 160

Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 31

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 31

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1           5           10          15

```

48

```

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aga ttt atg ttc aac ttt ttg
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu
          20           25           30

```

96

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa
 Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
 35 40 45

144

```

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
      50           55           60

```

192

aaa cgt cac cag gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 ; 80

240

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

288

```

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
          100           105           110

```

336

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
115 120 125

384

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
cga cat ata gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597
<210> 32	
<211> 198	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de la clytine	
<400> 32	
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15	
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30	
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45	
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60	
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Ile Gly Met 65 70 75 80	
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95	
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110	
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125	
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140	
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	

Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 33

<211> 597

<212> DNA

<213> Mitrocoma cellularia

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(597)

<223>

<400> 33

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat 48
 Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
 1 5 10 15

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac 96
 Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys Met Phe Asn Phe Leu Asp
 20 25 30

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct 144
 Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
 35 40 45

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa caa acc aaa 192
 Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
 50 55 60

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa 240
 Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
 65 70 75 80

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg 288
 Tyr Asp Lys Asp Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg 336
 Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
 100 105 110

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga 384
 Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
 115 120 125

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct 432
 Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
 130 135 140

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	528
cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597

<210> 34

<211> 198

<212> PRT

<213> Mitrocoma cellularia

<400> 34

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15
--

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80
--

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110
--

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125
--

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140
--

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160
--

Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175
--

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195

<210> 35

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(597)

<223>

<400> 35

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat	48
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp	
1 5 10 15	

aat cca aaa tgg att gct cga cac agg cac atg ttc aac ttc ctt gac	96
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp	
20 25 30	

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct	144
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala	
35 40 45	

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa gaa caa acc aaa	192
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50 55 60	

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa	240
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu	
65 70 75 80	

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg	288
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg	
85 90 95	

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg	336
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu	
100 105 110	

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga	384
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg	
115 120 125	

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct	432
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala	
130 135 140	

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	528
cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597

<210> 36

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<400> 36

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195

<210> 37

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(597)

<223>

<400> 37

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat	48
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp	
1 5 10 15	

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac	96
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp	
20 25 30	

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct	144
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala	
35 40 45	

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa gaa caa acc aaa	192
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50 55 60	

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa	240
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu	
65 70 75 80	

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg	288
Tyr Asp Lys Asp Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg	
85 90 95	

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg	336
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu	
100 105 110	

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga	384
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg	
115 120 125	

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct	432
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala	
130 135 140	

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc
 Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys
 145 150 155 160
 480
 gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga cga
 Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg
 165 170 175
 528
 cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac
 His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190
 576
 ggt ggt gct gta cct tat taa
 Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195
 597
 <210> 38
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine
 <400> 38
 Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
 1 5 10 15
 Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
 20 25 30
 le Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
 35 40 45
 er Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
 50 55 60
 rg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
 5 70 75 80
 yr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95
 eu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
 100 105 110
 le Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
 115 120 125
 n Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
 130 135 140
 y Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys
 5 150 155 160
 p Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg
 165 170 175

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195

<210> 39

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 39

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat	48
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp	
1 5 10 15	

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac	96
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp	
20 25 30	

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct	144
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala	
35 40 45	

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa caa acc aaa	192
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50 55 60	

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa	240
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu	
65 70 75 80	

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg	288
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg	
85 90 95	

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg	336
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu	
100 105 110	

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga	384
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg	
115 120 125	

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct	432
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala	
130 135 140	

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc
 Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys
 145 . 150 155 . 160

gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa
 Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln
 165 170 175

cat ata gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac 576
 His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190

ggt ggt gct gta cct tat taa
Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 40

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<400> 40

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
 1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
35 40 45

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
115 120

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys
145 150 155 160

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195

<210> 41

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(597)

<223>

<400> 41		
atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat		48
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp		
1 5 10 15		
aat cca aaa tgg att gct cga cac agg cac atg ttc aac ttc ctt gac		96
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp		
20 25 30		
atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct		144
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala		
35 40 45		
tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa caa acc aaa		192
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys		
50 55 60		
cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa		240
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu		
65 70 75 80		
tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg		288
Tyr Asp Lys Asp Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg		
85 90 95		
ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg		336
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu		
100 105 110		
atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga		384
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg		
115 120 125		
aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct		432
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala		
130 135 140		

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga cga Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg 165 170 175	528
cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597

<210> 42	
<211> 198	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine	
<400> 42	
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg 165 170 175	

His	Leu	Gly	Phe	Trp	Tyr	Ser	Val	Asp	Pro	Thr	Cys	Glu	Gly	Leu	Tyr
180							185						190		
Gly Gly Ala Val Pro Tyr															
195															

<210> 43

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 43

atg	tca	atg	ggc	agc	aga	tac	gca	gtc	aag	ctt	acg	act	gac	ttt	gat	48
Met	Ser	Met	Gly	Ser	Arg	Tyr	Ala	Val	Lys	Leu	Thr	Thr	Asp	Phe	Asp	
1				5				10					15			

aat	cca	aaa	tgg	att	gct	cga	cac	agg	cac	atg	ttc	aac	ttc	ctt	gac	96
Asn	Pro	Lys	Trp	Ile	Ala	Arg	His	Arg	His	Met	Phe	Asn	Phe	Leu	Asp	
				20				25				30				

atc	aat	tca	aat	ggc	caa	atc	aat	ctg	aat	gaa	atg	gtc	cat	aag	gct	144
Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Gln	Ile	Asn	Leu	Asn	Glu	Met	Val	His	Lys	Ala	
				35				40			45					

tca	aac	att	atc	tgc	aag	aag	ctt	gga	gca	aca	gaa	caa	acc	aaa	192	
Ser	Asn	Ile	Ile	Cys	Lys	Lys	Leu	Gly	Ala	Thr	Glu	Glu	Gln	Thr	Lys	
				50			55		60							

cgt	cat	caa	aag	tgt	gtc	gaa	gac	ttc	ttt	ggg	gga	gct	ggt	ttg	gaa	240
Arg	His	Gln	Lys	Cys	Val	Glu	Asp	Phe	Phe	Gly	Gly	Ala	Gly	Leu	Glu	
				65			70		75			80				

tat	gac	aaa	gat	acc	aca	tgg	cct	gag	tac	atc	gaa	gga	tgg	aag	agg	288
Tyr	Asp	Lys	Asp	Thr	Thr	Trp	Pro	Glu	Tyr	Ile	Glu	Gly	Trp	Lys	Arg	
				85			90		95							

ttg	gct	aag	act	gaa	ttg	gaa	agg	cat	tca	aag	aat	caa	gtc	aca	ttg	336
Leu	Ala	Lys	Thr	Glu	Leu	Glu	Arg	His	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Thr	Leu	
				100			105			110						

atc	cga	tta	tgg	ggt	gat	gct	ttg	ttc	gac	atc	att	gac	aaa	gat	aga	384
Ile	Arg	Leu	Trp	Gly	Asp	Ala	Leu	Phe	Asp	Ile	Ile	Asp	Lys	Asp	Arg	
				115			120			125						

aat	gga	tcg	gtt	tcg	tta	gac	gaa	tgg	atc	cag	tac	act	cat	tgt	gct	432
Asn	Gly	Ser	Val	Ser	Leu	Asp	Glu	Trp	Ile	Gln	Tyr	Thr	His	Cys	Ala	
				130			135			140						

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	528
cat ata gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597

<210> 44

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<400> 44

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190
Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 45

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 45

```

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
   1           5           10          15

```

48

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

96

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
35 40 45

144

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa gaa caa acc aaa	Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50	55	60

192

```

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65          70          75          .          80

```

240

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg
 Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95

288

```

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
          100      105      110

```

336

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
115 120 125

384

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135 140

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145. 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga cga Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg 165 170 175	528
cat ata gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597
 <210> 46	
 <211> 198	
 <212> PRT	
 <213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine	
 <400> 46	
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg 165 170 175	

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195

<210> 47

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 47

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat	48
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp	
1 5 10 15	

aat cca aaa tgg att gct cga cac agg cac atg ttc aac ttc ctt gac	96
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp	
20 25 30	

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct	144
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala	
35 40 45	

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa caa acc aaa	192
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50 55 60	

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa	240
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu	
65 70 75 80	

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg	288
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg	
85 90 95	

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg	336
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu	
100 105 110	

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga	384
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg	
115 120 125	

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct	432
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala	
130 135 140	

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga cga Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg 165 170 175	528
cat ata gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597

<210> 48

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<400> 48

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg 165 170 175	

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
 195

<210> 49

<211> 588

<212> DNA

<213> Obelia longissima

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(588)

<223>

<400> 49		
atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca		48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro		
1 5 10 15		
cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat		96
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn		
20 25 30		
gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat		144
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp		
35 40 45		
gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat		192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His		
50 55 60		
caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt		240
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly		
65 70 75 80		
aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg		288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala		
85 90 95		
act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt		336
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg		
100 105 110		
gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt		384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly		
115 120 125		
aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc		432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile		
130 135 140		

50

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg 480
 Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160

 gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga caa cat ctt 528
 Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu
 165 170 175

 gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac 576
 Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

 gga gtt ccc taa 588
 Gly Val Pro
 195

 <210> 50

 <211> 195

 <212> PRT

 <213> *Obelia longissima*

 <400> 50

 Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro 500
 1 5 10 15

 Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn 550
 20 25 30

 Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp 600
 35 40 45

 Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His 650
 50 55 60

 Ile Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly 700
 5 70 75 80

 ys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala 750
 85 90 95

 hr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg 800
 100 105 110

 lu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly 850
 115 120 125

 hr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile 900
 130 135 140

 er Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu 950
 15 150 155 160

 p Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu 1000
 165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 51

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(588)

<223>

<400> 51		
atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca		48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro		
1 5 10 15		
cga tgg atc aaa aga cac agg cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat		96
Arg Trp Ile Lys Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn		
20 25 30		
gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat		144
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp		
35 40 45		
gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat		192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His		
50 55 60		
caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt		240
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly		
65 70 75 80		
aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg		288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala		
85 90 95		
act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt		336
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg		
100 105 110		
gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt		384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly		
115 120 125		
aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc		432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile		
130 135 140		

52

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg	480
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aca cat ctt	528
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu	
165 170 175	
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac	576
Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn	
180 185 190	
gga gtt ccc taa	588
Gly Val Pro	
195	
<210> 52	
<211> 195	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline	
<400> 52	
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	
Arg Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu	
165 170 175	

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 53

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(588)

<223>

<400> 53

atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca	48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	

cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat	96
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat	144
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat	192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt	240
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg	288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt	336
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt	384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc	432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	

54

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu 145 150 155 160	480
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gag atg aca aga cga cat ctt Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu 165 170 175	528
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn 180 185 190	576
gga gtt ccc taa Gly Val Pro 195	588

<210> 54

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<400> 54

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro 1 5 10 15	
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn 20 25 30	
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp 35 40 45	
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His 50 55 60	
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly 65 70 75 80	
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala 85 90 95	
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg 100 105 110	
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly 115 120 125	
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile 130 135 140	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu 145 150 155 160	
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu 165 170 175	

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 55

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(588)

<223>

<400> 55

atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca	48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	

cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat	96
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat	144
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat	192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt	240
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg	288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt	336
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt	384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc	432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg	480
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga caa cat att	528
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Ile	
165 170 175	
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac	576
Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn	
180 185 190	
gga gtt ccc taa	588
Gly Val Pro	
195	
<210> 56	
<211> 195	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline	
<400> 56	
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Ile	
165 170 175	

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 57

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(588)

<223>

<400> 57

atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca	48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	

cga tgg atc aaa aga cac agg cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat	96
Arg Trp Ile Lys Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat	144
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat	192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt	240
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg	288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt	336
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt	384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc	432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	

58

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg 480
 Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160
 gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga cga cat ctt 528
 Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu
 165 170 175
 gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac 576
 Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190
 gga gtt ccc taa 588
 Gly Val Pro
 195
 <210> 58
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> séquence dérivée par mutation de l'obéline
 <400> 58
 Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro 588
 1 5 10 15
 Arg Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
 20 25 30
 Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45
 Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
 50 55 60
 Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 80
 ys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
 85 90 95
 hr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110
 lu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
 115 120 125
 hr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
 130 135 140
 er Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160
 sp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu
 165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 59

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(588)

<223>

<400> 59

atg tct tca aaa taa gca gtt aaa ccc aag act gag ttt gat aat cca
 Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
 1 5 10 15

cga tgg atc aaa aga cac agg cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat
Arg Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat · 144
 Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat 192
 Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
 50 55 60

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt
 Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 80

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg 288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt 336
 Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt 384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc 432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
100 105 110 115 120 125 130 135 140

60

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg
 Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160

480

gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga caa cat att
 Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Ile
 165 170 175

528

gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac
 Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

576

gga gtt ccc taa
 Gly Val Pro
 195

588

<210> 60

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<400> 60

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
 1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
 20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
 50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
 85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
 115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
 130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Ile
 165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 61

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(588)

<223>

<400> 61		
atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca		48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro		
1 5 10 15		
cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat		96
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn		
20 25 30		
gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat		144
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp		
35 40 45		
gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat		192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His		
50 55 60		
caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt		240
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly		
65 70 75 80		
aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg		288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala		
85 90 95		
act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt		336
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg		
100 105 110		
gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt		384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly		
115 120 125		
aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc		432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile		
130 135 140		

62

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg		480
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu		
145	150	155
		160
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga cga cat att		528
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Ile		
165	170	175
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac		576
Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn		
180	185	190
gga gtt ccc taa		588
Gly Val Pro		
195		
<210> 62		
<211> 195		
<212> PRT		
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline		
<400> 62		
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro		
1	5	10
		15
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn		
20	25	30
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp		
35	40	45
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His		
50	55	60
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly		
65	70	75
		80
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala		
85	90	95
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg		
100	105	110
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly		
115	120	125
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile		
130	135	140
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu		
145	150	155
		160
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Ile		
165	170	175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 63

<211> 588

<212> DNA

<213>

<220>

<221> CDS

488

```

<400> 63
atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1           5           10          15

```

49

cga tgg atc aaa aga cac agg cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat
Arg Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

96

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

144

```

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
      50          55          60

```

192

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt
 Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 80

240

```

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
          85           90           95

```

288

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt	Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100	105	110

336

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt gg
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

384

```

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 .           135          140

```

432

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa ggc aca ttt cga cat tgc gat ttg 480
 Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 145 150 155 160
 gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga cga cat att 528
 Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Ile
 165 170 175
 gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac 576
 Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190
 gga gtt ccc taa 588
 Gly Val Pro
 195
 <210> 64
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> séquence dérivée par mutation de l'obéline
 <400> 64
 Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
 5 10 15
 Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
 20 25 30
 Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45
 Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
 50 55 60
 Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 70 75 80
 Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
 85 90 95
 Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110
 Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
 115 120 125
 Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
 130 135 140
 Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu
 150 155 160
 Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Ile
 165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 65

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 65

```

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1           5                   10                  15

```

```

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac agg cat atg ttc aat ttc
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe
          20           25           30

```

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac ggg atg gtc tac
 Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Gly Met Val Tyr
 35 40 45 .

```

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
      50          55          60

```

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga
 Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
 65 70 75 80

```

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
          85           90           95

```

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa
 Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
 130 135 140

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	480
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	528
aga caa cat tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 180 185 190	576
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 195	600
<210> 66	
<211> 199	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine	
<400> 66	
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp 1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe 20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Gly Met Val Tyr 35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln 50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly 65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp 85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro 100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys 115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	

Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190
 Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 67

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (597)

<223>

<400> 67

```

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
   1           5           10          15

```

48

```

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
          20           25           30

```

96

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac
 Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr
 35 40 45

144

```

aag gca tct gat att gcc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa
Lys Ala Ser Asp Ile Ala Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
      50           55           60

```

192

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65 70 75 : 80

240

```

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
          85           90           95

```

288

```

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
          100           105           110

```

336

```

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys
           115          120          125

```

384

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	480
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	528
aga cga cat tta gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 180 185 190	576
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 195	600

<210> 68

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 68

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp 1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe 20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr 35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Ala Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln 50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly 65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp 85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro 100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys 115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	

Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 69

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 69

```

atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1           5           10          15

```

48

ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
20 25 30

96

ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gag gag atg gtc tac
 Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr
 35 40 45

144

```

aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
      50          55          60

```

192

```

gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65           70           75           :   80

```

240

atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg
 Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
 85 90 95

288

```

aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
          100           105           110

```

336

```

acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt ggc aaa
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Gly Lys
           115          120          125

```

384

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	480
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	528
aga caa cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 180 185 190	576
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 195	600

<210> 70

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 70

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp 1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe 20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr 35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln 50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly 65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp 85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro 100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Gly Lys 115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 71

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 71		
atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac		48
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp		
1 5 10 15		
ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc		96
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe		
20 25 30		
ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac		144
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr		
35 40 45		
aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa		192
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln		
50 55 60		
gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga		240
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly		
65 70 75 80		
atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg		288
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp		
85 90 95		
aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca		336
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro		
100 105 110		
acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa		384
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys		
115 120 125		
gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gga tgg aaa gca tac acc aaa		432
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Gly Trp Lys Ala Tyr Thr Lys		
130 135 140		

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	480
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	528
aga caa cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys 180 185 190	576
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro 195	600

<210> 72

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 72

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp 1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe 20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr 35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln 50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly 65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp 85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro 100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys 115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Gly Trp Lys Ala Tyr Thr Lys 130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg 145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr 165 170 175	

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 73

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 73		
atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac		48
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp		
1 5 10 15		
ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc		96
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe		
20 25 30		
ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac		144
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr		
35 40 45		
aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa		192
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln		
50 55 60		
gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga		240
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly		
65 70 75 80		
atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg		288
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp		
85 90 95		
aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca		336
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro		
100 105 110		
acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa		384
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys		
115 120 125		
gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa		432
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys		
130 135 140		

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca tcc aga	480
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Ser Arg	
145 150 155 160	
gtg tgc gat att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca	528
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	
aga caa cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag	576
Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys	
180 185 190	
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa	600
Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro	
195	

<210> 74

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 74

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys	
130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Ser Arg	
145 150 155 160	
Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 75

<211> 600

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(597)

<223>

<400> 75		
atg ctt tat gat gtt cct gat tat gct agc ctc aaa ctt aca tca gac		48
Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp		
1 5 10 15		
ttc gac aac cca aga tgg att gga cga cac aag cat atg ttc aat ttc		96
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe		
20 25 30		
ctt gat gtc aac cac aat gga aaa atc tct ctt gac gag atg gtc tac		144
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr		
35 40 45		
aag gca tct gat att gtc atc aat aac ctt gga gca aca cct gag caa		192
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln		
50 55 60		
gcc aaa cga cac aaa gat gct gta gaa gcc ttc ttc gga gga gct gga		240
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly		
65 70 75 80		
atg aaa tat ggt gtg gaa act gat tgg cct gca tat att gaa gga tgg		288
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp		
85 90 95		
aaa aaa ttg gct act gat gaa ttg gag aaa tac gcc aaa aac gaa cca		336
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro		
100 105 110		
acg ctc atc cgt ata tgg ggt gat gct ttg ttt gat atc gtt gac aaa		384
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys		
115 120 125		
gat caa aat gga gcc att aca ctg gat gaa tgg aaa gca tac acc aaa		432
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys		
130 135 140		

gct gct ggt atc atc caa tca tca gaa gat tgc gag gaa aca ttc aga	480
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145 150 155 160	
gtg tgc ggt att gat gaa agt gga caa ctc gat gtt gat gag atg aca	528
Val Cys Gly Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	
aga caa cat ata gga ttt tgg tac acc atg gat cct gct tgc gaa aag	576
Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys	
180 185 190	
ctc tac ggt gga gct gtc ccc taa	600
Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro	
195	

<210> 76

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<400> 76

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp	
1 5 10 15	
Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe	
20 25 30	
Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr	
35 40 45	
Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln	
50 55 60	
Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly	
65 70 75 80	
Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp	
85 90 95	
Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro	
100 105 110	
Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys	
115 120 125	
Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys	
130 135 140	
Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg	
145 150 155 160	
Val Cys Gly Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr	
165 170 175	

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

 Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 77

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 77

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1          5          10          15

```

```

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg 96
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
          20           25           30

```

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gga atc gtc tcc aaa 144
 Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Gly Ile Val Ser Lys
 35 40 45

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc 192
 Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
 50 55 60

aaa cgt cac caa gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg
 Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
 65 70 75 : 80

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa 288
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct 336
 Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac 384
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc 432
 Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
 130 135 140

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat	480
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His	
145 150 155 160	
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc acc aga	528
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg	
165 170 175 .	
caa cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt	576
Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu	
180 185 190 .	
tac ggc aat ttt gtt cct taa	597
Tyr Gly Asn Phe Val Pro	
195	

<210> 78

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 78

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Gly Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
115 120 125

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His
145 150 155 160

Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 79

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(594)

<223>

<400> 79

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc	48
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe	
1 5 10 15	

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg	96
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu	
20 25 30	

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa	144
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys	
35 40 45	

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc	192
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr	
50 55 60	

aaa cgt cac cag gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg	240
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met	
65 70 75 80	

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa	288
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys	
85 90 95	

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct	336
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser	
100 105 110	

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt ggc aaa gac	384
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Gly Lys Asp	
115 120 125	

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc	432
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile	
130 135 140	

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat	480
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His	
145 150 155 160	
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga	528
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg	
165 170 175	
caa cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt	576
Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu	
180 185 190	
tac ggc aat ttt gtt cct taa	597
Tyr Gly Asn Phe Val Pro	
195	

<210> 80

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 80

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
 1 5 10 15
 Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
 20 25 30
 Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
 35 40 45
 Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
 50 55 60
 Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
 65 70 75 80
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95
 Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Gly Lys Asp
 115 120 125
 Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
 130 135 140
 Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His
 145 150 155 160
 Asp Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
 165 170 175

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 81

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 81

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc	48
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe	
1 5 10 15	

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg	96
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu	
20 25 30	

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa	144
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys	
35 40 45	

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc	192
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr	
50 55 60	

aaa cgt cac cag gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg	240
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met	
65 70 75 80	

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa	288
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys	
85 90 95	

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct	336
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser	
100 105 110	

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac	384
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp	
115 120 125	

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gga tgg aag gct tat gga cga atc	432
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Gly Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile	
130 135 140	

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
caa cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597

<210> 82

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 82

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met 65 70 75 80
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Gly Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 83

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 83

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1          5           10          15

```

48

```

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
          20           25           30

```

96

```

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
            35          40          45

```

144

```

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
      50          55          60

```

192

aaa cgt cac caa gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 : 80

240

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

288

```

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
          100           105           110

```

336

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125

384

gga agt ggc tca atc agt ttg gac gaa tgg aag gct tat gga cga atc
 Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
 130 135 140

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc tcc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Ser Lys His	480
145 150 155 160	
tgc gat ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg	528
165 170 175	
caa cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu	576
180 185 190	
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro	597
195	

<210> 84

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 84

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15	
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30	
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45	
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60	
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met 65 70 75 80	
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95	
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110	
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125	
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140	
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Ser Lys His 145 150 155 160	
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 85

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 85

```

atg gct gac act gca tca aaa tac gcc gtc aaa ctc aga ccc aac ttc
Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
   1           5                   10                  15

```

48

gac aac cca aaa tgg gtc aac aga cac aaa ttt atg ttc aac ttt ttg		
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu		
20	25	30

96

gac att aac ggc gac gga aaa atc act ttg gat gaa atc gtc tcc aaa
 Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
 35 40 45

144

```

gct tcg gat gac att tgc gcc aaa ctt gga gca aca cca gaa cag acc
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
      50          55          60

```

192

aaa cgt cac caa gat gct gtc gaa gct ttc ttc aaa aag att ggt atg
 Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
 65 70. 75 : 80

240

gat tat ggt aaa gaa gtc gaa ttc cca gct ttt gtt gat gga tgg aaa
 Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
 85 90 95

288

gaa ctg gcc aat tat gac ttg aaa ctt tgg tct caa aac aag aaa tct
 Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
 100 105 110

.336

ttg atc cgc gac tgg gga gaa gct gtt ttc gac att ttt gac aaa gac
 Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp
 115 120 125

384

tct gga atc tgc tca tca gac gaa gac gcc gaa aag acc ttc aaa cat Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160	480
tgc ggt ttg gac aac agt ggc aaa ctt gat gtt gat gag atg acc aga Cys Gly Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175	528
caa cat ttg gga ttc tgg tac acc ttg gac ccc aac gct gat ggt ctt Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu 180 185 190	576
tac ggc aat ttt gtt cct taa Tyr Gly Asn Phe Val Pro 195	597

<210> 86

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<400> 86

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe 1 5 10 15
Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu 20 25 30
Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys 35 40 45
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr 50 55 60
Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met 65 70 75 80
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys 85 90 95
Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser 100 105 110
Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp 115 120 125
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile 130 135 140
Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His 145 150 155 160
Cys Gly Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg 165 170 175

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
 180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
 195

<210> 87

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 87

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat	48
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp	
1 5 10 15	

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac	96
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp	
20 25 30	

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gga atg gtc cat aag gct	144
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Gly Met Val His Lys Ala	
35 40 45	

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa gaa caa acc aaa	192
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50 55 60	

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa	240
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu	
65 70 75 80	

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg	288
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg	
85 90 95	

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg	336
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu	
100 105 110	

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga	384
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg	
115 120 125	

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct	432
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala	
130 135 140	

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	528
cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597
<210> 88	
<211> 198	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine	
<400> 88	
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Gly Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	

His	Leu	Gly	Phe	Trp	Tyr	Ser	Val	Asp	Pro	Thr	Cys	Glu	Gly	Leu	Tyr
			180					185						190	

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 89

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 89

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

48

```

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
          20           25           30

```

96

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct
 Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
 35 40 45

144

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa gaa caa acc aaa	Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50	55	60

192

```

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65          70          75          : 80

```

240

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg
 Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95

288

```

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
          100           105           110

```

336

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att ggc aaa gat aga
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Gly Lys Asp Arg
115 120 125

384

90

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	528
cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597
<210> 90	
<211> 198	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine	
<400> 90	
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Gly Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 91

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (594)

<223>

<400> 91

```

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
   1           5                   10                  15

```

48

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

96

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct
 Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
 35 40 45

144

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa gaa caa acc aaa	Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys	
50	55	60

192

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa
 Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
 65 70 75 ; 80

240

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg
 Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95

288

```

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
          100           105           110

```

336

```

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
    115           120           125

```

384

```

aat gga tcg gtt tcg tta gac gga tgg atc cag tac act cat tgt gct
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Gly Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
      130          135          140

```

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	528
cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597
 <210> 92	
<211> 198	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine	
<400> 92	
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Gly Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 93

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 93

```

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1           5                   10                  15

```

48

```

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
          20           25           30

```

96

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
35 40 45

144

192

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa
 Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
 65 70 75 ; 80

240

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg
 Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95

288

```

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
          100           105           110

```

336

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga
 Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
 115 120 125

384

```

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
    130          135          140

```

94

ggc atc caa cag tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca tcc gca cat tgc Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Ser Ala His Cys 145 150 155 160	480
gat tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	528
cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr 180 185 190	576
ggt ggt gct gta cct tat taa Gly Gly Ala Val Pro Tyr 195	597
<210> 94	
<211> 198	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine	
<400> 94	
Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp 1 5 10 15	
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp 20 25 30	
Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala 35 40 45	
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys 50 55 60	
Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu 65 70 75 80	
Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg 85 90 95	
Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu 100 105 110	
Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg 115 120 125	
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala 130 135 140	
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Ser Ala His Cys 145 150 155 160	
Asp Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln 165 170 175	

<210> 95

<211> 597

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(594)

<223>

<400> 95

atg tca atg ggc agc aga tac gca gtc aag ctt acg act gac ttt gat 48
 Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
 1 5 10 15

aat cca aaa tgg att gct cga cac aag cac atg ttc aac ttc ctt gac 96
Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

atc aat tca aat ggc caa atc aat ctg aat gaa atg gtc cat aag gct 144
 Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Glu Met Val His Lys Ala
 35 40 45

tca aac att atc tgc aag aag ctt gga gca aca gaa gaa caa acc aaa 192
Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

cgt cat caa aag tgt gtc gaa gac ttc ttt ggg gga gct ggt ttg gaa 240
 Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
 65 70 75 ; 80

tat gac aaa gat acc aca tgg cct gag tac atc gaa gga tgg aag agg 288
 Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
 85 90 95

ttg gct aag act gaa ttg gaa agg cat tca aag aat caa gtc aca ttg 336
 Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
 100 105 110

atc cga tta tgg ggt gat gct ttg ttc gac atc att gac aaa gat aga 384
 Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg
 115 120 125

```

aat gga tcg gtt tcg tta gac gaa tgg atc cag tac act cat tgt gct      432
Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
   130          135          140

```

96

```

ggc atc caa caa tca cgt ggg caa tgc gaa gct aca ttt gca cat tgc      480
Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys
145          150          155          .          160

```

ggt tta gat ggt gac ggt aaa ctt gat gtg gac gaa atg aca aga caa 528
 Gly Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln
 165 170 175

cat ttg gga ttt tgg tat tcg gtc gac cca act tgt gaa gga ctc tac 576
 His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
 180 185 190

ggt ggt gct gta cct tat taa 597
Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 96

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<400> 96

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
 1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
 50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Arg

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Glu Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Phe Ala His Cys

115 120 125 130 135 140 145 150 155 160
 Gly Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Cln

165 170 175

<210> 97

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(585)

<223>

<400> 97

```

atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1           5           10          15

```

48

```
cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20          25          30
```

96

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gga att gtg tcc aag gca tct gat
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Gly Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

144

```

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
      50           55           60

```

192

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt
 Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 : 80

240

```

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
          85           90           95

```

288

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt
 Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110

336

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

384

```

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
          130           135           140

```

A32

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg	480
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aca cat ctt	528
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu	
165 170 175	
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac	576
Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn	
180 185 190	
gga gtt ccc taa	588
Gly Val Pro	
195	
<210> 98	
<211> 195	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline	
<400> 98	
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Gly Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu	
165 170 175	

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 99

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(585)

<223>

<400> 99

```

atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
   1           5           10          15

```

48

cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

96

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

144

```

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
      50          55          60

```

192

```

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 . . . 70 . . . 75 . . . 80

```

240

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 . . 90 . . 95

288

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt
 Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 102 105 110

236

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc ggc aaa gat gga agt ggt
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Gly Lys Asp Gly Ser Gly

284

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile

10

100

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa ggc aca ttt cga cat tgc gat ttg	480
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga caa cat ctt	528
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu	
165 170 175	
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac	576
Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn	
180 185 190	
gga gtt ccc taa	588
Gly Val Pro	
195	
<210> 100	
<211> 195	
<212> PRT	
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline	
<400> 100	
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Gly Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu	
145 150 155 160	
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu	
165 170 175	

101

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
195

210 101

<211> 588

<212> DNA

<213>

<220>

<221> CDS

222

<400> 101
atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca 48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

```
cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat 96
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
          20           25           30
```

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat 144
 Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
 35 40 45

```

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat      192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
      50          55          60

```

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt 240
 Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
 65 70 75 80

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg 288
 Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
 85 90 95

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt 336
 Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
 100 105 110

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt 384
 Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
 115 120 125

aca atc act ttg gac gga tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc 432
 Thr Ile Thr Leu Asp Gly Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
 130 135 140

102

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc gat ttg		480	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu			
145	150	155	
		160	
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gag atg aca aga caa cat ctt		528	
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu			
165	170	175	
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac		576	
Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn			
180	185	190	
gga gtt ccc taa		588	
Gly Val Pro			
195			
<210> 102			
<211> 195			
<212> PRT			
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline			
<400> 102			
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro			
1	5	10	15
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn			
20	25	30	
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp			
35	40	45	
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His			
50	55	60	
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly			
65	70	75	80
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala			
85	90	95	
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg			
100	105	110	
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ile Thr Leu Asp Gly Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile			
130	135	140	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Asp Leu			
145	150	155	160
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu			
165	170	175	

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
 195

<210> 103

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(585)

<223>

<400> 103

atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca	48
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro	
1 5 10 15	

cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat	96
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn	
20 25 30	

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat	144
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp	
35 40 45	

gac ata tgt gcc aag ctc gaa gcc aca cca gaa caa aca aaa cgc cat	192
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His	
50 55 60	

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt	240
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg	288
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala	
85 90 95	

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt	336
Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100 105 110	

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt	384
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly	
115 120 125	

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc	432
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile	
130 135 140	

104

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca tcc cga cat tgc gat ttg Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Ser Arg His Cys Asp Leu 145 150 155 160	480
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga caa cat ctt Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu 165 170 175	528
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn 180 185 190	576
gga gtt ccc taa Gly Val Pro 195	588

<210> 104

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<400> 104

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro 1 5 10 15	
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn 20 25 30	
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp 35 40 45	
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His 50 55 60	
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly 65 70 75 80	
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala 85 90 95	
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg 100 105 110	
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly 115 120 125	
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile 130 135 140	
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Ser Arg His Cys Asp Leu 145 150 155 160	
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu 165 170 175	

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
 180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 105

<211> 588

<212> DNA

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(585)

<223>

<400> 105

```

atg tct tca aaa tac gca gtt aaa ctc aag act gac ttt gat aat cca
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1           5                  10                         15

```

48

cga tgg atc aaa aga cac aag cac atg ttt gat ttc ctc gac atc aat
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

96

gga aat gga aaa atc acc ctc gat gaa att gtg tcc aag gca tct gat
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

144

192

caa gtt tgt gtt gaa gct ttc ttt aga gga tgt gga atg gaa tat ggt
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 ; 80

240

```

aaa gaa att gcc ttc cca caa ttc ctc gat gga tgg aaa caa ttg gcg
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
          85           90           95

```

288

act tca gaa ctc aag aaa tgg gca aga aac gaa cct act ctc att cgt	Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg	
100	105	110

336

gaa tgg gga gat gct gtc ttt gat att ttc gac aaa gat gga agt ggt
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

384

aca atc act ttg gac gaa tgg aaa gct tat gga aaa atc tct ggt atc
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

432

106

tct cca tca caa gaa gat tgt gaa gcg aca ttt cga cat tgc ggt ttg		480
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Gly Leu		
145 150 155 160		
gac aac agt ggt gac ctt gat gtt gac gag atg aca aga caa cat ctt		528
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu		
165 170 175		
gga ttc tgg tac act ttg gac cca gaa gct gat ggt ctc tat ggc aac		576
Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn		
180 185 190		
gga gtt ccc taa		588
Gly Val Pro		
195		
<210> 106		
<211> 195		
<212> PRT		
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline		
<400> 106		
Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro		
1 5 10 15		
Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn		
20 25 30		
Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp		
35 40 45		
Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His		
50 55 60		
Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly		
65 70 75 80		
Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala		
85 90 95		
Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg		
100 105 110		
Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly		
115 120 125		
Thr Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile		
130 135 140		
Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Phe Arg His Cys Gly Leu		
145 150 155 160		
Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu		
165 170 175		

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 107

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> X représente V ou A

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(127)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(138)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(163)

<223> X représente D ou G

<400> 107

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1 5 10 15

108

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe
 20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Xaa Met Val Tyr
 35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Xaa Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
 50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
 65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
 85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
 100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Xaa Lys
 115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
 130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Xaa Arg
 145 150 155 160

Val Cys Xaa Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
 165 170 175

Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
 180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 195

<210> 108

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (45)...(45)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)...(54)

<223> X représente V ou A

<221> MISC_FEATURE
<222> (127)..(127)
<223> X représente D ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (138)..(138)
<223> X représente E ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (159)..(159)
<223> X représente F ou S
<221> MISC_FEATURE
<222> (163)..(163)
<223> X représente D ou G
<400> 108

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1 5 10 15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Xaa Met Val Tyr
35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Xaa Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Xaa Lys
115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Xaa Arg
145 150 155 160

Val Cys Xaa Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
165 170 175

Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 109

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> X représente V ou A

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(127)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(138)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(163)

<223> X représente D ou G

<400> 109

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1 5 10 15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Xaa Met Val Tyr
35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Xaa Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Xaa Lys
115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Xaa Arg
145 150 155 160

Val Cys Xaa Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
165 170 175

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 110

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> X représente V ou A

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(127)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(138)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(163)

<223> X représente D ou G

<400> 110

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1 5 10 15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe
20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Xaa Met Val Tyr
35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Xaa Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Xaa Lys
115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Xaa Arg
145 150 155 160

Val Cys Xaa Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
165 170 175

Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 111
<211> 199
<212> PRT
<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> X représente E ou G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(54)
<223> X représente V ou A
<221> MISC_FEATURE
<222> (127)..(127)
<223> X représente D ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (138)..(138)
<223> X représente E ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (159)..(159)
<223> X représente F ou S
<221> MISC_FEATURE
<222> (163)..(163)
<223> X représente D ou G
<400> 111

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1 5 10 15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe
20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Xaa Met Val Tyr
35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Xaa Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Xaa Lys
115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Xaa Arg
145 150 155 160

Val Cys Xaa Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
165 170 175

Arg Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 112

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> X représente V ou A

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(127)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(138)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(163)

<223> X représente D ou G

<400> 112

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1 5 10 15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Xaa Met Val Tyr
35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Xaa Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Xaa Lys
115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Xaa Arg
145 150 155 160

Val Cys Xaa Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
165 170 175

Arg Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 113

<211> 199

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'aequorine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> X représente V ou A

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(127)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(138)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(163)

<223> X représente D ou G

<400> 113

Met Leu Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Thr Ser Asp
1 5 10 15

Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Arg His Met Phe Asn Phe
20 25 30

Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Xaa Met Val Tyr
35 40 45

Lys Ala Ser Asp Ile Xaa Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
50 55 60

Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
65 70 75 80

Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
85 90 95

Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
100 105 110

Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Xaa Lys
115 120 125

Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Xaa Arg
145 150 155 160

Val Cys Xaa Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
165 170 175

Arg Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
180 185 190

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
195

<210> 114

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(126)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (137)..(137)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(158)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(162)

<223> X représente D ou G

<400> 114

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1 5 10 15

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp
115 120 125

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Xaa Lys His
145 150 155 160

Cys Xaa Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 115

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(126)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (137)..(137)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(158)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(162)

<223> X représente D ou G

<400> 115

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1 5 10 15

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp
115 120 125

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Xaa Lys His
145 150 155 160

120

Cys Xaa Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 116

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)...(44)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(126)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (137)..(137)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(158)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(162)

<223> X représente D ou G

<400> 116

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1 5 10 15

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp
115 120 125

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Xaa Lys His
145 150 155 160

Cys Xaa Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 117

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(126)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (137)..(137)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(158)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(162)

<223> X représente D ou G

<400> 117

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe				
1	5	10	15	

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu				
20	25	30		

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys				
35	40	45		

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr				
50	55	60		

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met				
65	70	75	80	

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys				
85	90	95		

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser				
100	105	110		

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp				
115	120	125		

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile				
130	135	140		

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Xaa Lys His				
145	150	155	{	160

Cys Xaa Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg				
165	170	175		

Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu				
180	185	190		

Tyr Gly Asn Phe Val Pro				
195				

<210> 118

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(44)
<223> X représente E ou G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (126)..(126)
<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE
<222> (137)..(137)
<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE
<222> (162)..(162)
<223> X représente D ou G

<400> 118

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1 5 10 15

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp
115 120 125

124

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Xaa Lys His
145 150 155 160

Cys Xaa Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Gln His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 119

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(126)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (137)..(137)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(158)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(162)

<223> X représente D ou G

<400> 119

125

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1 5 10 15

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp
115 120 125

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Xaa Lys His
145 150 155 160

Cys Xaa Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 120

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la clytine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(126)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (137)..(137)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(158)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(162)

<223> X représente D ou G

<400> 120

Met Ala Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Arg Pro Asn Phe
1 5 10 15

Asp Asn Pro Lys Trp Val Asn Arg His Arg Phe Met Phe Asn Phe Leu
20 25 30

Asp Ile Asn Gly Asp Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys
35 40 45

Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Thr
50 55 60

Lys Arg His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Met
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asp Gly Trp Lys
85 90 95

Glu Leu Ala Asn Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser
100 105 110

Leu Ile Arg Asp Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp
115 120 125

Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile
130 135 140

Ser Gly Ile Cys Ser Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Xaa Lys His
145 150 155 160

Cys Xaa Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
165 170 175

Arg His Ile Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu
180 185 190

Tyr Gly Asn Phe Val Pro
195

<210> 121
<211> 198
<212> PRT
<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43) .. (43)
<223> X représente E ou G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (125) .. (125)
<223> X représente D ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (136) .. (136)
<223> X représente E ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (157) .. (157)
<223> X représente F ou S
<221> MISC_FEATURE
<222> (161) .. (161)
<223> X représente D ou G
<400> 121

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Xaa Met Val His Lys Ala
35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Xaa Lys Asp Arg
115 120 125

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Xaa Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135 140

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Xaa Ala His Cys
145 150 155 160

Xaa Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln
165 170 175

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 122

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)...(43)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (125)...(125)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (136)...(136)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (157)...(157)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)...(161)

<223> X représente D ou G

<400> 122

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Xaa Met Val His Lys Ala
35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Xaa Lys Asp Arg
115 120 125

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Xaa Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135 140

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Xaa Ala His Cys
145 150 155 160

Xaa Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg
165 170 175

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 123

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (125)..(125)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(136)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (157)..(157)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(161)

<223> X représente D ou G

<400> 123

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Xaa Met Val His Lys Ala
35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Xaa Lys Asp Arg
115 120 125

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Xaa Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135 140

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Xaa Ala His Cys
145 150 155 160

Xaa Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln
165 170 175

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 124

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)...(43)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (125)...(125)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (136)...(136)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (157)...(157)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)...(161)

<223> X représente D ou G

<400> 124

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Xaa Met Val His Lys Ala
35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

132

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Xaa Lys Asp Arg
115 120 125

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Xaa Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135 140

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Xaa Ala His Cys
145 150 155 160

Xaa Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg
165 170 175

His Leu Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 125

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (125)..(125)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(136)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (157)..(157)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(161)

<223> X représente D ou G

<400> 125

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Xaa Met Val His Lys Ala
35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Xaa Lys Asp Arg
115 120 125

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Xaa Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135 140

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Xaa Ala His Cys
145 150 155 160

Xaa Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln
165 170 175

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 126

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)...(43)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (125) .. (125)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(136)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (157)..(157)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(161)

<223> x représente D ou G

<400> 126

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
 1 5 10 .15

Asn	Pro	Lys	Trp	Ile	Ala	Arg	His	Lys	His	Met	Phe	Asn	Phe	Leu	Asp
			20					25					30		

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Xaa Met Val His Lys Ala
35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Xaa Lys Asp Arg
115 120 125

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Xaa Ala His Cys
 145 . 150 155 160

Xaa Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg
165 170 175

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 127

<211> 198

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de la mitrocomine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (125)..(125)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(136)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (157)..(157)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(161)

<223> X représente D ou G

<400> 127

Met Ser Met Gly Ser Arg Tyr Ala Val Lys Leu Thr Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

Asn Pro Lys Trp Ile Ala Arg His Arg His Met Phe Asn Phe Leu Asp
20 25 30

Ile Asn Ser Asn Gly Gln Ile Asn Leu Asn Xaa Met Val His Lys Ala
35 40 45

Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Leu Gly Ala Thr Glu Glu Gln Thr Lys
50 55 60

Arg His Gln Lys Cys Val Glu Asp Phe Phe Gly Gly Ala Gly Leu Glu
65 70 75 80

Tyr Asp Lys Asp Thr Thr Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg
85 90 95

Leu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Arg His Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ile Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Xaa Lys Asp Arg
115 120 125

Asn Gly Ser Val Ser Leu Asp Xaa Trp Ile Gln Tyr Thr His Cys Ala
130 135 140

Gly Ile Gln Gln Ser Arg Gly Gln Cys Glu Ala Thr Xaa Ala His Cys
145 150 155 160

Xaa Leu Asp Gly Asp Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg
165 170 175

His Ile Gly Phe Trp Tyr Ser Val Asp Pro Thr Cys Glu Gly Leu Tyr
180 185 190

Gly Gly Ala Val Pro Tyr
195

<210> 128

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (123)..(123)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(134)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(155)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente D ou G

<400> 128

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Xaa Arg His Cys Xaa Leu
145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu
165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 129

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (123)..(123)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(134)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(155)

<223> X représente F ou S
<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente D ou G

<400> 129

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

139

Thr Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Xaa Arg His Cys Xaa Leu
145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu
165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 130

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (123)..(123)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(134)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(155)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente D ou G

<400> 130

140

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Xaa Arg His Cys Xaa Leu
145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Ile
165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 131

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)...(41)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (123)...(123)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(134)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(155)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente D ou G

<400> 131

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Xaa Arg His Cys Xaa Leu
145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu
165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 132
<211> 195
<212> PRT
<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> X représente E ou G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (123)..(123)
<223> X représente D ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (134)..(134)
<223> X représente E ou G
<221> MISC_FEATURE
<222> (155)..(155)
<223> X représente F ou S
<221> MISC_FEATURE
<222> (159)..(159)
<223> X représente D ou G
<400> 132

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Xaa Arg His Cys Xaa Leu
145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Ile
165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 133

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)...(41)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (123)...(123)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)...(134)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)...(155)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)...(159)

<223> X représente D ou G

<400> 133

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Lys His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Xaa Arg His Cys Xaa Leu
145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Ile
165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

<210> 134

<211> 195

<212> PRT

<213> séquence dérivée par mutation de l'obéline

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)...(41)

<223> X représente E ou G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (123)..(123)

<223> X représente D ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(134)

<223> X représente E ou G

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(155)

<223> X représente F ou S

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(159)

<223> X représente D ou G

<400> 134

Met Ser Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asp Phe Asp Asn Pro
1 5 10 15

Arg Trp Ile Lys Arg His Met Phe Asp Phe Leu Asp Ile Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Xaa Ile Val Ser Lys Ala Ser Asp
35 40 45

Asp Ile Cys Ala Lys Leu Glu Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg His
50 55 60

Gln Val Cys Val Glu Ala Phe Phe Arg Gly Cys Gly Met Glu Tyr Gly
65 70 75 80

Lys Glu Ile Ala Phe Pro Gln Phe Leu Asp Gly Trp Lys Gln Leu Ala
85 90 95

Thr Ser Glu Leu Lys Trp Ala Arg Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
100 105 110

Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Xaa Lys Asp Gly Ser Gly
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Xaa Trp Lys Ala Tyr Gly Lys Ile Ser Gly Ile
130 135 140

Ser Pro Ser Gln Glu Asp Cys Glu Ala Thr Xaa Arg His Cys Xaa Leu
145 150 155 160

Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Ile
165 170 175

Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Glu Ala Asp Gly Leu Tyr Gly Asn
180 185 190

Gly Val Pro
195

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 janvier 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/006497 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/435, C12N 15/12, 15/62, G01N 33/68

(74) Mandataires : **DEMACHY, Charles etc.; Gross-set-Fournier & Demachy SARL, 54, rue St. Lazare, F-75009 Paris (FR).**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2002/002492

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 12 juillet 2002 (12.07.2002)

(84) États désignés (regional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt : français

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(26) Langue de publication : français

**(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale:** 22 janvier 2004

(30) Données relatives à la priorité :
01/09293 12 juillet 2001 (12.07.2001) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **LAMBOLÉZ, Bertrand [FR/FR]; 54, rue Louis Blanc, F-75010 Paris (FR). GIBELIN, Nathalie [FR/FR]; 16, Chemin de la Justice, F-92290 Chatenay Malabry (FR). BOUROUT, Gaëlle [FR/FR]; 17, rue Albert Bayet, F-75013 Paris (FR). TRICOIRE, Ludovic, Eric [FR/FR]; 7, rue Théophile Gautier, F-92120 Montrouge (FR). COURJEAN, Olivier, Arsène [FR/FR]; 32, boulevard de Reuilly, F-75012 Paris (FR). TSUZUKI, Keisuke [JP/JP]; 4-21-7 Iwagami-machi, Maebashi, Gunma 371-0035 (JP). ROSSIER, Jean [BE/FR]; 322, rue Saint-Jacques, F-75005 Paris (FR).**

(54) Title: MUTATED PHOTOPROTEINS AND THEIR USES

(54) Titre : PHOTOPROTÉINES MUTEES ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns mutated photoproteins derived from isolated jellyfish photoproteins, said mutated photoproteins being characterised in that they exhibit a thermostability higher than that of the photoproteins from which they are derived, and are called thermostable mutated photoproteins, and/or a luminescence duration longer than that of the photoproteins from which they are derived, and are called persistent mutated photoproteins. The invention also concerns the use of said mutated photoproteins in methods for detecting *in vitro* molecules in a biological sample, methods for detecting compounds with enzymatic activity in a biological sample, or methods for detecting intracellular calcium variations.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet des photoprotéines mutées dérivées des photoprotéines isolées de méduses, lesdites photoprotéines mutées étant caractérisées par une thermostabilité supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, et sont désignées photoprotéines mutées thermostables, et/ou par un temps de luminescence supérieur à celui des photoprotéines dont elles dérivent, et sont désignées photoprotéines mutées persistantes. L'invention concerne également l'utilisation des photoprotéines mutées susmentionnées dans le cadre de la mise en œuvre de procédés de détection *in vitro* de molécules dans un échantillon biologique, de procédés de détection de composés à activité enzymatique dans un échantillon biologique, ou de procédés de détection des variations de calcium intracellulaire.

WO 2003/006497 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/02492

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C07K14/435 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 541 309 A (PRASHER DOUGLAS) 30 July 1996 (1996-07-30) abstract; claims 3,4; figure SEQ.ID.9; table 4 ----	1-6,8,9, 12-25 11
Y	----- -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 2003

Date of mailing of the international search report

27/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02492

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 26 January 1998 (1998-01-26) MOCHIZUKI, HIROSHI ET AL: "Preparation of aequorin derivatives with improved stability" Database accession no. 128:32705 XP002198117 abstract -& JP 09 278796 A (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD., JAPAN) 28 October 1997 (1997-10-28) -& DATABASE REGISTRY 'Online! RN 199488-59-0, "Aequorin '59-arginine! (Aequorea victoria)" XP002198118 abstract ---	1,3,4
Y	TSUJI F I ET AL: "SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS OF THE CALCIUM-BINDING PHOTOPROTEIN AEQUORIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 83, no. 21, 1986, pages 8107-8111, XP002198115 1986 ISSN: 0027-8424 abstract ---	7,10,11
A	BALDWIN T O ET AL.: "The complete nucleotide sequence of the lux regulon of Vibrio fischeri and the luxABN region of Photobacterium leiognathi and the mechanism of control of bacterial bioluminescence" JOURNAL OF BIOLUMINESCENCE AND CHEMILUMINESCENCE, vol. 4, no. 1, 1989, pages 326-341, XP001064768 abstract ---	1-6,8,9, 12-25
A	OHMIYA YOSHIHIRO ET AL: "Bioluminescence of the calcium binding photoprotein, aequorin, after histidine modification." FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, vol. 320, no. 3, 1993, pages 267-270, XP002198116 ISSN: 0014-5793 abstract ---	1-6,8,9, 12-25
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/02492

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200211 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-078318 XP002198119 & JP 2001 270899 A (CHISSO CORP), 2 October 2001 (2001-10-02) abstract -----	1-6,8,9, 12-25

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely

1. Claims 1-6, 8, 9, 11-25 in part in part

Mutant photoproteins isolated from jellyfish and having a greater heat stability than the photoproteins from which they are derived, characterised in that they include a heat stability-increasing mutation, having a suppression of the lysine (K) in position 27 of the aequorin, contained in motif RHGX1MFX2, where X1 = H or F and X2 = N or D, said peptide motif being retained in said photoproteins, or a substitution of said lysine by an optionally natural amino acid, particularly a substitution of said lysine by an arginine, the use of photoproteins isolated from jellyfish for preparing said mutant photoproteins, nucleotide sequences, a vector, host cells, a method for preparing mutant photoproteins, the use of mutant photoproteins, methods for the *in vitro* detection of proteins or antigens or nucleic acids, and kits for carrying out methods.

2. Claims 1-6, 8, 9, 11-25 in part in part

Mutant photoproteins isolated from jellyfish and having a greater heat stability than the photoproteins from which they are derived, characterised in that they include a heat stability-increasing mutation, having a suppression of the glutamine (Q) contained in motif DEMTRQHLGFWY, said peptide motif being retained in said photoproteins, or a substitution of said glutamine by an optionally natural amino acid, particularly a substitution of said glutamine by an arginine, or the provision of mutant photoproteins characterised in that they include a heat stability-increasing mutation, having a suppression of the leucine (L) contained in the above-mentioned motif DEMTRQHLGFWY, or a substitution of said leucine by an optionally natural amino acid, particularly a substitution of said leucine by an isoleucine, the use of photoproteins isolated from jellyfish for preparing said mutant photoproteins, nucleotide sequences, a vector, host cells, a method for preparing mutant photoproteins, the use of mutant photoproteins, methods for the *in vitro* detection of proteins or antigens or nucleic acids, and kits for carrying out methods.

3. Claims 1-5, 7, 8, 10, 12-25 in part

Mutant photoproteins isolated from jellyfish and having a greater luminescence than the photoproteins from which they are derived, characterised in that they include a luminescence duration-increasing mutation, having a suppression of the glutamate (E) contained in motif DX1NX2X3GX4IX5LX6E, where X1 = V or I, X2 = H, G or S, X3 = N or D, X4 = K or Q, X5 = S, T or N and X6 = D or N, said peptide motif being retained in said photoproteins, or a substitution of said glutamate by an optionally natural amino acid, with the proviso that it is not serine, particularly a substitution of said glutamate by a small amino acid such as glycine, alanine, cysteine or threonine, or having a suppression of the first aspartate (D) contained in motif DKDX1X2GX3X4X5LDE, where X1 = Q, G or R, X2 = N or S, X3 = A, S or T, X4 = I or V, and X5 = T or S, said peptide motif being retained in said photoproteins, or a substitution of said aspartate by an optionally natural amino acid, with the proviso that it is not serine, particularly a substitution of said aspartate by a small amino acid such as glycine, alanine, cysteine or threonine, or having a suppression of the glutamate (E) contained in the above-mentioned motif DKDX1X2GX3X4X5LDE, said peptide motif being retained in said photoproteins, or a substitution of said glutamate by an optionally natural amino acid, with the proviso that it is not serine, particularly a substitution of said glutamate by a small amino acid such as glycine, alanine, cysteine or threonine, the use of photoproteins isolated from jellyfish for preparing said mutant photoproteins, nucleotide sequences, a vector, host cells, a method for preparing mutant photoproteins, the use of mutant photoproteins, methods for the *in vitro* detection of proteins or antigens or nucleic acids, and kits for carrying out methods.

4. Claims 1-5, 7, 8, 10, 12-25 in part

Mutant photoproteins isolated from jellyfish and having a greater luminescence than the photoproteins from which they are derived, characterised in that they include a luminescence duration-increasing mutation, having a suppression of the phenylalanine (F) contained in motif EX1TFX2X3, where X = E, K or A, X2 = R, K or A and X3 = V or H, said peptide motif being retained in said photoproteins, or a substitution of said phenylalanine by an optionally natural amino acid, particularly a substitution of said phenylalanine by a serine, or a small amino acid such as glycine, alanine, cysteine or threonine, the use of photoproteins isolated from

jellyfish for preparing said mutant photoproteins, nucleotide sequences, a vector, host cells, a method for preparing mutant photoproteins, the use of mutant photoproteins, methods for the *in vitro* detection of proteins or antigens or nucleic acids, and kits for carrying out methods, in so far as they are not part of inventions 1 and 2.

5. Claims 1-5, 7, 8, 10, 12-25 in part

Mutant photoproteins isolated from jellyfish and having a greater luminescence than the photoproteins from which they are derived, characterised in that they include a luminescence duration-increasing mutation, having a suppression of the first aspartate (D) contained in motif DX₁DX₂X₃GX₄LDVDE, where X₁ = I or L, X₂ = E, N or G, X₃ = S or D and X₄ = Q, K or D, said peptide motif being retained in said photoproteins, or a substitution of said aspartate by an optionally natural amino acid, with the proviso that it is not serine, particularly a substitution of said aspartate by a small amino acid such as glycine, alanine, cysteine or threonine, the use of photoproteins isolated from jellyfish for preparing said mutant photoproteins, nucleotide sequences, a vector, host cells, a method for preparing mutant photoproteins, the use of mutant photoproteins, methods for the *in vitro* detection of proteins or antigens or nucleic acids, and kits for carrying out methods, in so far as they are not part of inventions 1 and 2.

6. Claims 1-5, 7, 8, 10, 12-25 in part

Mutant photoproteins isolated from jellyfish and having a greater luminescence than the photoproteins from which they are derived, characterised in that they include a luminescence duration-increasing mutation, having a suppression of the valine in position 54 of peptide sequence SEQ ID NO 2 of aequorin, or a substitution of said valine by an optionally natural amino acid, particularly a substitution of said valine by an alanine, or by a small amino acid such as glycine, alanine, cysteine or threonine, the use of photoproteins isolated from jellyfish for preparing said mutant photoproteins, nucleotide sequences, a vector, host cells, a method for preparing mutant photoproteins, the use of mutant photoproteins, methods for the *in vitro* detection of proteins or antigens or nucleic acids, and kits for carrying out methods, in so far as they are not part of inventions 1 and 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 02/02492

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5541309	A 30-07-1996	US 5360728 A	01-11-1994
JP 9278796	A 28-10-1997	NONE	
JP 2001270899	A 02-10-2001	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 02/02492

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/12 C12N15/62 C07K14/435 G01N33/68

Selon la classification Internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 541 309 A (PRASHER DOUGLAS) 30 juillet 1996 (1996-07-30) abrégé; revendications 3,4; figure SEQ.ID.9; tableau 4 ----	1-6,8,9, 12-25 11
Y	----- -/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 juin 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/06/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°s _____ se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. Les revendications n°s _____ se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

3. Les revendications n°s _____ sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s _____
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s _____

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/02492

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE CA 'en ligne' CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 26 janvier 1998 (1998-01-26) MOCHIZUKI, HIROSHI ET AL: "Preparation of aequorin derivatives with improved stability" Database accession no. 128:32705 XP002198117 abrégé	1, 3, 4
Y	-& JP 09 278796 A (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD., JAPAN) 28 octobre 1997 (1997-10-28) -& DATABASE REGISTRY 'en ligne' RN 199488-59-0, "Aequorin '59-arginine! (Aequorea victoria)" XP002198118 abrégé	7, 10, 11
Y	TSUJI F I ET AL: "SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS OF THE CALCIUM-BINDING PHOTOPROTEIN AEQUORIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 83, no. 21, 1986, pages 8107-8111, XP002198115 1986 ISSN: 0027-8424 abrégé	7, 10, 11
A	BALDWIN T O ET AL.: "The complete nucleotide sequence of the lux regulon of Vibrio fischeri and the luxABN region of Photobacterium leiognathi and the mechanism of control of bacterial bioluminescence" JOURNAL OF BIOLUMINESCENCE AND CHEMILUMINESCENCE, vol. 4, no. 1, 1989, pages 326-341, XP001064768 abrégé	1-6, 8, 9, 12-25
A	OHMIYA YOSHIHIRO ET AL: "Bioluminescence of the calcium binding photoprotein, aequorin, after histidine modification." FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, vol. 320, no. 3, 1993, pages 267-270, XP002198116 ISSN: 0014-5793 abrégé	1-6, 8, 9, 12-25

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/02492

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200211 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-078318 XP002198119 & JP 2001 270899 A (CHISSO CORP), 2 octobre 2001 (2001-10-02) abrégé</p> <p>-----</p>	1-6, 8, 9, 12-25

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-6,8,9,11-25 partiellement partiellement

Photoprotéines mutées isolées de méduses ayant une thermostabilité supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, caractérisées en ce qu'elles comprennent une mutation augmentant leur thermostabilité, ayant une suppression de la lysine (K) , en position 27 de l'aequorine, contenue dans le motif RHXX1MFX2 dans lequel X1=H ou F, et X2= N ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette lysine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette lysine par une arginine ,utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation desdites photoprotéines mutées , séquences nucléotidiques , vecteur, cellules hôtes , procédé de préparation de photoprotéines mutées utilisation de photoprotéines mutées , procédés de détection in vitro de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques ,kits pour la mise en oeuvre de procédés

2. revendications: 1-6,8,9,11-25 partiellement partiellement

Photoprotéines mutées isolées de méduses ayant une thermostabilité supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, caractérisées en ce qu'elles comprennent une mutation augmentant leur thermostabilité, ayant suppression de la glutamine (Q) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette glutamine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette glutamine par une arginine , ou la provision de photoprotéines mutées caractérisées en ce qu'elles comprennent une mutation augmentant leur thermostabilité, ayant suppression de la leucine (L) contenue dans le motif DEMTRQHLGFWY susmentionné, ou substitution de cette leucine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette leucine par une isoleucine, utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation desdites photoprotéines mutées , séquences nucléotidiques , vecteur, cellules hôtes , procédé de préparation de photoprotéines mutées utilisation de photoprotéines mutées , procédés de détection in vitro de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques ,kits pour la mise en oeuvre de procédés

3. revendications: 1-5,7,8,10,12-25 partiellement

Photoprotéines mutées isolées de méduses ayant une luminescence supérieure à celle des photoprotéines dont

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

elles dérivent, caractérisées en ce qu'elles comprennent une mutation augmentant leur temps de luminescence ayant une suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DX1NX2X3GX4IX5LX6E dans lequel X1=V ou I, X2=H, G ou S, X3=N ou D, X4=K ou Q, X5=S,T ou N, et X6=D ou N, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine , ou ayant une suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DKDX1X2GX3X4X5LDE dans lequel X1, =Q, G ou R, X2=N ou S, X3=A, S ou T, X4=I ou V, et X5=T ou S, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine, ou ayant une suppression du glutamate (E) contenu dans le motif DKDX1X2GX3X4X5LDE susmentionné, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de ce glutamate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de ce glutamate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine ,ou la thréonine,utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation desdites photoprotéines mutées , séquences nucléotidiques vecteur, cellules hôtes , procédé de préparation de photoprotéines mutées utilisation de photoprotéines mutées , procédés de détection in vitro de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques ,kits pour la mise en oeuvre de procédés .

4. revendications: 1-5,7,8,10,12-25 partiellement

Photoprotéines mutées isolées de méduses ayant une luminescence supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, caractérisées en ce qu'elles comprennent une mutation augmentant leur temps de luminescence ayant une suppression de la phénylalanine (F) contenue dans le motif EX1TFX2X3 dans lequel X=E,K ou A, X2=R, K ou A, et X3=V ou H, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cette phénylalanine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette phénylalanine par une sérine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine ,utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation desdites photoprotéines mutées , séquences nucléotidiques , vecteur, cellules hôtes , procédé de préparation de photoprotéines mutées utilisation de photoprotéines mutées , procédés de détection in vitro de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques ,kits pour la mise en oeuvre de procédés , pour autant que ne faisant pas parties des inventions

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

1 ou 2 .

5. revendications: 1-5,7,8,10,12-25 partiellement

Photoprotéines mutées isolées de méduses ayant une luminescence supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, caractérisées en ce qu'elles comprennent une mutation augmentant leur temps de luminescence ayant une suppression du premier aspartate (D) contenu dans le motif DX1DX2X3GX4LDVDE, dans lequel X1=I ou L, X2=E, N ou G, X3=S ou D, et X4=Q, K ou D, ce motif peptidique étant conservé chez lesdites photoprotéines, ou substitution de cet aspartate par un acide aminé naturel ou non, à l'exclusion de la sérine, notamment substitution de cet aspartate par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine ,utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation desdites photoprotéines mutées , séquences nucléotidiques ,vecteur, cellules hôtes , procédé de préparation de photoprotéines mutées utilisation de photoprotéines mutées , procédés de détection in vitro de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques ,kits pour la mise en oeuvre de procédés , pour autant que ne faisant pas parties des inventions 1 ou 2 .

6. revendications: 1-5,7,8,10,12-25 partiellement

Photoprotéines mutées isolées de méduses ayant une luminescence supérieure à celle des photoprotéines dont elles dérivent, caractérisées en ce qu'elles comprennent une mutation augmentant leur temps de luminescence ayant une suppression de la valine en position 54 de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 de l'aequorine, ou substitution de cette valine par un acide aminé naturel ou non, notamment substitution de cette valine par une alanine, ou par un acide aminé de petite taille tel que la glycine, lalanine, la cystéine, ou la thréonine ,utilisation de photoprotéines isolées de méduses pour la préparation desdites photoprotéines mutées , séquences nucléotidiques , vecteur, cellules hôtes , procédé de préparation de photoprotéines mutées utilisation de photoprotéines mutées , procédés de détection in vitro de protéines ou antigènes ou d'acides nucléiques ,kits pour la mise en oeuvre de procédés , pour autant que ne faisant pas parties des inventions 1 ou 2 .

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 02/02492

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5541309 A	30-07-1996 US	5360728 A	01-11-1994
JP 9278796 A	28-10-1997	AUCUN	
JP 2001270899 A	02-10-2001	AUCUN	